Wolfgang Greul

Untersuchungen über das Verhalten von Mykobakteriophagen gegen verschiedene Umweltseinflüsse

Tübingen

Cuxhaven
1965

8133

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0066

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. R.-E. Bader

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VERHALTEN VON MYKOBAKTERIOPHAGEN GEGEN VERSCHIEDENE UMWELTSEINFLÜSSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Greul
aus Cuxhaven

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Dekan: Professor Dr. med. H. H a r m s

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. K n a p p

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R.-E. B a d e r

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Untersuchungsmaterial und Untersuchungstechnik	5
1. Untersuchungsmaterial	5
a) Mykobakteriophagenstämme	5
b) Mykobakterienstämme	5
c) Nährböden	6
2. Untersuchungstechnik	7
a) Phagenanreicherung	7
b) Nachweis der Plaques	7
c) Bestimmung des Phagentiters	9
d) Bestimmung der Bakterienzahl	9
III. Untersuchungsergebnisse	1o
1. Zum Plaques-Nachweis geeignete Mykobakteriennährböden	1o
2. Bestimmung des Phagenspektrums innerhalb der untersuchten Stämme	13
3. Abhängigkeit der Phagenvermehrung von der Bebrütungsdauer der Kultur des Wirtsstammes und der Keimzahl	15
4. Inaktivierung der B- und R-Phagen in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Suspensionsmediums	18
5. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration einer Mykobakterienkultur auf die Vermehrung der B- und R-Phagen	23
6. Temperaturempfindlichkeit der B- und R-Phagen	26
7. Thermoresistenz der B- und R-Phagen in Proteoselösung mit verschiedenem pH als Suspensionsmittel	3o
8. Inaktivierung der B- und R-Phagen durch chemische Mittel	38
IV. Diskussion	43
V. Zusammenfassung	55
VI. Literaturverzeichnis	58

I. Einleitung und Problemstellung

Der erste Beweis einer Existenz gegen Mykobakterien wirksamer Bakteriophagen wurde von GARDNER und WEISER (1947) erbracht. Schon vor ihnen hatte STEENKEN jr. (1938) in alternden Kulturen von Mycobacterium tuberculosis Stamm H37Rv spontane Lyse gesehen und die Filtrierbarkeit des Agens beschrieben, ohne einen Bakteriophagen sicher nachweisen zu können. Der von GARDNER und WEISER mit der Erdanreicherungstechnik isolierte Phage lysierte nur seinen Wirtsstamm von M.smegmatis, aber keinen Stamm von anderen M.smegmatis und M.phlei. Die von ihm im Plattentest verursachten Phagenlöcher, "plaques", hatten einen Durchmesser von etwa 3 mm und zeigten eine zentrale Zone mit kompletter Lyse, die von einem Hof mit teilweiser Lyse umgeben war. In den darauffolgenden Jahren wurden von zahlreichen Untersuchern verschiedene Mykobakteriophagen aus Erde und Abwässern gewonnen (WHITTAKER, 1950, FROMAN u. Mitarb., 1954, TAKEYA und YOSHIMURA, 1957) und ohne Erfolg versucht, eine einheitliche Nomenklatur für die Mykobakteriophagen zu finden bzw. die Phagen zur Klassifizierung von Mykobakterien heranzuziehen. Nachdem PENSO und ORTALI (1949) 5 Phagen, die gegen verschiedene saprophytäre Mykobakterien aktiv waren, isolieren konnten, schlugen sie eine Systematik der Mykobakteriophagen vor, die sich auf folgende Kriterien stützt: 1. Einheitliche Morphologie im elektronenoptischen Bild. 2. Begrenzte lytische Aktivität gegenüber verschiedenen Mykobakterienarten. 3. Inaktivierung durch ein spezifisches Antiphagenserum. Zur weiteren Klassifizierung der Phagen wurden dann von BOWMAN (1958) und von TAKEYA und YOSHIMURA (1957) die Grösse ihrer Plaques, die Bestimmung ihrer Latenzperiode und ihre Vermehrungskurve herangezogen.

Von den meisten Untersuchern wurden die Mykobakteriophagen durch Buchstaben und Zahlen gekennzeichnet. So wurden die D-Phagen, die FROMAN, WILL und BOGEN (1954) isolierten, auf Grund verschiedener Merkmale klassifiziert. FROMAN und Mitarb. stellten fest, dass die als D28, D29, D32 und D34 bezeichneten Phagen sich auf dem Wirtsstamm durch verschiedene Plaquesmuster

unterschieden. Diese Unterscheidungsmerkmale bezogen sich auf die Grösse der Plaques, ihre Erscheinungsform und Begrenzung. Eine weitere Unterscheidung dieser 4 Phagen gelang SELLERS, TOKUYASU, PRICE und FROMAN (1957) durch elektronenoptische Aufnahmen. Obwohl alle bis heute im Elektronenmikroskop dargestellten Mykobakteriophagen eine einheitliche Kopf-Schwanzgliederung erkennen liessen, variierten doch die Form der Köpfe und die Länge der Schwänze. Während die Köpfe der Phagen D28,D29 und D32 die Form von regelmässigen Sechsecken besassen, war der Kopf des D34-Phagen kugelförmig. Die Kopfdurchmesser lagen bei den Phagen zwischen 65 und 80 m und die Längen der Schwänze zwischen 125 und 250 mμ. SELLERS und RUNNALS (1961) unterschieden die Phagen mit Hilfe von spezifischen Antiphagensera. Jeder Phage wurde nur durch sein homologes Antiserum neutralisiert. Es bestand keine gekreuzte Neutralisation durch heterologe Antisera.

Von ähnlicher Bedeutung wie die Systematisierungsversuche der Mykobakteriophagen sind Versuche, Mykobakterien mit Hilfe von Phagen innerhalb der Gattung und Species zu differenzieren. Derartige Untersuchungen sind aber nur vereinzelt durchgeführt worden (FROMAN u. Mitarb., 1954, HNATKO, 1953/56, HIKAWA, 1959, REDMOND, 1963). Die Ursache ist darin zu suchen, dass die bis heute isolierten Mykobakteriophagen bis auf eine Ausnahme ein breites Wirtsspektrum besitzen. PENSO und ORTALI (1949), die als erste säurefeste saprophytäre Mykobakterien mit ihren 5 Phagenstämmen zu typisieren versuchten, fanden unter 89 Stämmen 38, die gegen einen oder mehrere Phagen sensibel waren. FROMAN, WILL und BOGEN (1954) prüften 231 Tbc-Stämme auf ihre Empfindlichkeit gegen 4 Phagen. Unter ihnen waren 192 Stämme phagensensibel und 39 resistent. Die empfindlichen Stämme konnten auf Grund ihrer Phagenempfindlichkeitsmuster in 4 Gruppen unterteilt werden. FROMAN und Mitarb. (1955) versuchten 36 BCG-Stämme und 12 andere Tuberkelbakterienstämme zu typisieren. 14 dieser BCG-Stämme wurden durch alle 4 Phagen, weitere 14 durch 2 oder 3 Phagen lysiert. Es entstanden reproduzierbare Lysisbilder, nach denen 28 BCG-Stämme in Gruppen eingeteilt werden konnten. Auch HNATKO (1953/56) typisierte verschiedene Tuber-

kelbakterienstämme mit Phagen. Er verglich dabei das Bakteriophagenspektrum von 24 klassifizierten säurefesten Saprophyten mit dem unklassifizierter, von tuberkulösen Patienten isolierten Mykobakterien. Von 33 noch unklassifizierten säurefesten Kulturen konnte er 24 typisieren. Die meisten dieser Stämme hatten ein dem M.smegmatis entsprechendes Phagenmuster (KÄPPLER, 196o).

HIKAWA (1959) gelang es schliesslich als erstem, ein Schema zu entwerfen, nach dem es möglich war, einige Mykobakterienstämme zu differenzieren. Bei seinen Versuchen arbeitete er mit den Phagen DS6A, GS4E, AG1 und M9, mit denen er M.tuberculosis Stamm H37Rv und je einen Stamm von M.bovis, M.avium und M.kansasii, ausserdem einen nonphotochromogenen Mykobakterienstamm und den saprophytären Stamm ATCC 6o7 prüfte. Der DS6A-Phage war nur gegen seinen Wirtsstamm M.tuberculosis H37Rv und gegen einen Stamm von M.bovis, nicht aber gegen die anderen Stämme wirksam. Der GS4E-Phage lysierte nur die Stämme H37Rv und ATCC 6o7 und der AG1-Phage nur die Stämme H37Rv,ATCC 6o7, einen Stamm von M.bovis und M.kansasii. Mit dem M9-Phagen, der gegen humane und aviäre Stämme aktiv war, waren die Ergebnisse bei den anderen geprüften Stämmen unsicher. REDMOND (1963) gelang es dann, die gut bekannten Lysisbilder der DS6A- und D29-Phagen bei Mykobakterienstämmen zu reproduzieren. Als Teststämme verwandte er einen M.tuberculosis-Stamm, einen Stamm von M.kansasii, von M.smegmatis, einen nonphotochromogenen und den saprophytären Stamm ATCC 6o7. Dabei war der DS6A-Phage nur gegen den M.tuberculosis-Stamm, der D29-Phage nur gegen die Stämme M.tuberculosis und ATCC 6o7 wirksam.

Da zwischen der Entdeckung von Bakteriophagen durch d'HERELLE (1921) und der Isolierung von Mykobakteriophagen drei Jahrzehnte lagen, ist die Zahl der experimentellen Arbeiten über die Mykobakteriophagen noch klein. Bis heute liegen nur wenige Versuche über das Verhalten von Mykobakteriophagen gegen verschiedene Umweltseinflüsse vor. Wohl finden sich bei GARDNER und WEISER Angaben über die Temperaturempfindlichkeit des von ihnen entdeckten M.smegmatis-Phagen. Dieser Phage wurde von 75°C in 1o Minuten inaktiviert. WHITTAKER (195o) prüfte 2 von ihm iso-

lierte M.smegmatis-Phagen auf ihre Hitzebeständigkeit, und HNATKO (1953) konnte 11 Mykobakteriophagen durch Temperaturen zwischen 65°C und 85°C inaktivieren. REDMOND und CATER (1960) untersuchten den Phagen DS6A auf seine Thermoresistenz. SELLERS und RUNNALS (1961) setzten systematisch Mykobakterien physikochemischen Einflüssen aus. Sie prüften das Verhalten der Phagen D28, D29 und D32 bei verschiedenen Temperaturen, Einwirkungszeiten und pH-Werten des Suspensionsmittels, ihre Inaktivierung durch Antiphagensera und die Wirkung von Metallionen auf ihre Aktivität.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch Untersuchungen von zwei Mykobakteriophagenstämmen vor allem zu folgenden Fragen Stellung zu nehmen:

1. Verhalten gegenüber verschiedenen Temperaturen und Einwirkungszeiten.
2. Verhalten gegenüber verschiedenen Temperaturen bei wechselndem pH des Phagensuspensionsmediums bzw. bei verschiedenem pH der Bakterienkulturen, denen Phagen zugegeben wurden.
3. Verhalten gegenüber verschiedenen chemischen Substanzen (Phenol, Formalin, Chloroform und Merthiolat).

Weitere Versuche sollten über die Möglichkeiten einer optimalen Phagenanreicherung, Art und Aussehen der Plaques und das Wirtsspektrum der von uns untersuchten zwei Phagenstämme Auskunft geben.

II. Untersuchungsmaterial und Untersuchungstechnik

1. Untersuchungsmaterial

a) Mykobakteriophagenstämme

Für die Untersuchungen standen uns die beiden Mykobakteriophagenstämme SN47 (M.smegmatis-Phage) und ein M.lacticola-Phage zur Verfügung. Der SN47-Phage wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. BÖNICKE, Forschungsinstitut Borstel, und der M.lacticola-Phage von Frau Dr. CASTELNUOVO vom Istituto Superiore Di Sanita Roma überlassen. Im folgenden wird der SN47-Phage als "B-Phage" und der M.lacticola-Phage als "R-Phage" bezeichnet.

b) Mykobakterienstämme

Neben den Wirtsstämmen M.smegmatis SN 47 und M.lacticola wurden zur Bestimmung des Wirkungsspektrums der Phagen innerhalb der Gattung Mycobacterium noch verschiedene Mykobakterienspecies herangezogen. Die mit den laufenden Nummern und SN bezeichneten Stämme stammten aus dem Forschungsinstitut Borstel, die mit F bezeichneten vom Olive View Hospital in Kalifornien und der Stamm Timoteo, ein M.phlei-Stamm, aus dem Istituto Superiore Di Sanita Roma. Insgesamt betrug die Zahl der von uns in die Untersuchungen einbezogenen schnell und langsam wachsenden Mykobakterienstämme 25. Sie sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Untersuchte Mykobakterienstämme

Stämme	laufende Nummer
M. smegmatis	SN 1, SN 7, SN 8, SN 1o, SN 17, SN 47, F 21
M. lacticola	Synonym für M.smegmatis
M. phlei	SN 1o1, SN 1o9, F 89, M.Timoteo
M. fortuitum	SN 2o3, SN 212
M. thamnopheos	SN 12o1, SN 12o2
M. kansasii	SN 5o1, SN 515, F 284
M. avium	SN 3o4, SN 4o3 (Battey)
M. aquae	SN 6o1, SN 7o3
M. marinum	SN 1254, SN 13o1 (balnei)

Die Wirtsstämme der beiden Phagen, M.smegmatis SN 47 und M.lacticola, gehören zur Gruppe der schnell wachsenden Mykobakterien. Auf Löwenstein-Jensen-Nährböden war bei beiden Stämmen nach 24 Stunden bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C ein üppiges Wachstum festzustellen. Die Kolonien von M.smegmatis waren glatt, weich und von grau-rötlicher Färbung, die des M.lacticola ebenfalls glatt, weich und gelblich gefärbt.

c) Nährböden

α Zur Anreicherung der Mykobakterienstämme wurden Eiernährböden nach Löwenstein-Jensen verwendet (1932). Die Röhrchen wurden mit einem festen Gummistopfen verschlossen und in Schräglage 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Schon in dieser kurzen Zeit war ein üppiges Wachstum der Wirtsstämme M.smegmatis SN 47 und M.lacticola festzustellen, von denen für die weiteren Untersuchungen ausgegangen wurde.

β Zum Nachweis der lytischen Eigenschaften der Phagen erwies sich neben den von uns gefundenen und weiter unten beschriebenen Nährböden ein eiweissfreies synthetisches Nährmedium nach Lockemann in der Modifizierung von BÖNICKE als besonders geeignet:

Zusammensetzung:

Asparagin	5,o	g
Sekundäres Natriumphosphat $Na_2HPO_4 + 12\ H_2O$	3,o	g
Primäres Kaliumphosphat KH_2PO_4	4,o	g
Natriumcitrat	2,5	g
Ferriammonsulfat	o,ol	g
Natriumsulfat	5,o	g
Magnesiumchlorid	o,1	g
Glycerin	45	ccm
Aqua dest	looo	ml
Pron-Agar	13,o	g
pH	6,8	

γ Zur Vermehrung der Phagen und zur Abschwemmung der Mykobakterienstämme von den Subkulturen auf festen Nährmedien verwendeten wir 2%ige Glycerinbouillon, die auf den pH-Wert 7,9 eingestellt war.

2. Untersuchungstechnik

a) Phagenanreicherung

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, dass die Anreicherung der beiden Phagenstämme über Mykobakterienkulturen in flüssigen Medien zu höheren Phagentitern als auf festen führte, wählten wir für unsere weiteren Phagenanreicherungen folgende Versuchsanordnung:

Die Stämme von M.smegmatis und M.lacticola wurden auf Eiernährböden nach Löwenstein-Jensen überimpft und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschliessend schwemmten wir den Kulturrasen mit 5 ml 2%iger Glycerinbouillon ab. Zum Teil mussten die bröckligen, bzw. körnigen Sedimente zermörsert oder im Schüttelapparat zerkleinert werden, damit eine gleichmässig trübe Bakteriensuspension gewonnen werden konnte. Von der Bakteriensuspension, die soweit verdünnt wurde, dass sie etwa 5 - 1o.1o ^{7} Keime/ml aufwies, übertrugen wir o,5 ml in 1o ml Glycerinbouillon, die 2 Stunden bei 37°C bebrütet wurde. Nach Zugabe von o,5 ml der konzentrierten Phagensuspensionen wurden die jeweiligen Kulturen 16 - 2o Stunden, d.h. bis zur Klärung bei 37°C weiter bebrütet, dann zentrifugiert und durch bakteriendichte Ganzglasfilter ($K_5$11G5m) filtriert. Den Titer der im Filtrat befindlichen Phagen bestimmten wir mit der unten beschriebenen Agarschichtmethode. Bei den weiteren Anreicherungen wurde jeweils von o,5 ml der höchsten Phagenverdünnung, die gerade noch zu Plaques führte, ausgegangen. Für den B-Phagen wurden nach 6 Passagen über den Wirtsstamm M.smegmatis SN 47 7.1o^{8} und für den R-Phagen nach 4 Passagen 6.1o^{7} Partikel/ml bestimmt. Mit diesen beiden Anreicherungen, die in Glasstöpselflaschen im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt wurden, führten wir alle Versuche durch.

b) Nachweis der Plaques

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, dass mit dem Tropfverfahren eine genaue Bestimmung der in einem ml Phagensuspensionslösung vorhandenen Partikel nicht möglich war, wählten wir für alle Ver-

suche zum Nachweis von Plaques und zur Bestimmung ihrer Form und Grösse die von GRATIA (1936) beschriebene Agarschichtmethode ("overlay technic").

Als Nährböden diente uns das modifizierte Lockemann-Medium (S. 6) Bei jedem Ansatz gingen wir wie folgt vor:
o,7%iger Proteoseagar (Proteose Peptone Nr. 3, Difco, + o,7% Bacto Agar, Difco) wurde im Autoklaven verflüssigt und im Wasserbad bei 46°C flüssig gehalten.

Die jeweilige Mykobakterienkultur wurde, wie auf Seite 7 beschrieben, gewonnen, mit 5 ml 2%iger Glycerinbouillon abgeschwemmt und homogenisiert.

Für jeden Plattierungsschritt wurde 1 Tropfen der Bakteriensuspension in 2,5 ml des auf 46°C abgekühlten Proteoseagar übertragen.

Anschliessend wurden je 2,5 ml des Proteoseagar - Bakteriengemisches mit 1 ml der verschiedenen Phagensuspensionsverdünnung zusammengebracht und die Mischung sofort auf dem vorgetrockneten Lockemann-Medium gleichmässig plattiert.
Nach 3 Minuten war das Bakterien-Phagen-Agargemisch auf dem Nährboden erstarrt. Die Kulturen wurden 24 bis 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

In der Proteose-Agarschicht wuchsen die Mykobakterienstämme nur in kleinen Kolonien, die ihr Nährsubstrat aus den tieferen Schichten des Lockemann-Nährbodens bezogen. Dagegen war kein Wachstum der Bakterien nur in Proteose-Agar vorhanden. Die Plaques erschienen als klare Löcher in der undurchsichtigen Schicht des Bakterienrasens.

Tabelle 2: Erscheinungsbild der Plaques der B- und R-Phagen auf dem modifizierten Lockemann-Nährboden

Phage	Angereichert über Stamm	Plaques			
		Form	Grösse	Aussehen	Rand
B	M.smegm.SN 47	rund	1-3 mm	klar	zerfliessend
R	M.lacticola	rund	o,5-2 mm	klar	glatt, regelmässig

Wie in Tabelle 2 zusammengestellt, lagendie Durchmesser der Plaques für den B-Phagen zwischen 1 und 3 mm und für den R-Phagen zwischen o,5 und 2 mm. Die Plaques waren rund, die Ränder beim B-Phagen zerfliessend und beim R-Phagen glatt und regelmässig.

c) Bestimmung des Phagentiters

Die, wie unter b) angegeben, gewonnenen Platten wurden 24 - 48 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach dieser Zeit erfolgte die Bestimmung des Phagentiters durch Auszählen der Plaques. Der Phagentiter wurde auf 1 ml Phagensuspension berechnet.

d) Bestimmung der Bakterienzahl

Die Keimzahl/ml der bei der Phagenanreicherung bzw. beim Plattierungsschritt verwendeten Mykobakterien wurde mit Hilfe von Keimzählplatten bestimmt. Pro Bakteriensuspensionsverdünnung wurden 2 Agargussplatten angelegt und ausgezählt.

III. Untersuchungsergebnisse

1. Zum Plaquesnachweis geeignete Mykobakteriennährböden

Da die lytische Wirkung von Mykobakteriophagen in Kulturen, die auf undurchsichtigen Eiersubstraten gezüchtet wurden, nicht oder nur sehr schwer nachweisbar ist und bei den meisten Phagenversuchen mit anderen Keimarten durchsichtige Nährmedien verwendet werden, suchten wir entsprechende Medien auch für unsere Phagenversuche zu finden. Geprüft wurde vor allem die modifizierte Lockemann-Lösung (S. 6), ein 2%iger Glycerinagar und der Sauton-Nährboden mit folgender Zusammensetzung:

Asparagin	4,o	g
KH_2PO_4	o,5	g
$MgSO_4$	o,5	g
Ferriammoncitrat	o,o5	g
Acid.citric.krist	2,o	g
Glycerin	6o,o	ccm
Aqua dest	1ooo	ml
Pron-Agar	15,o	g
pH	7,2	

Ausserdem prüften wir zwei Nährböden, die wir selbst hergestellt hatten. Diese Medien waren wie folgt zusammengesetzt:

Nährboden I

Asparagin	3,5	g
Na_2HPO_4 + 12 H_2O	1,o	g
Histidinmonochlorat	o,5	g
Acid.citric. + 1 H_2O	o,5	g
$MgSO_4$	o,8	g
Ferriammonsulfat	o,o1	g
Glycerin	3o,o	ccm
Aqua dest.	1ooo	ml
Pron-Agar	14,o	g
pH	7,5	

Nährboden II

Asparagin	3,5	g
Na_2HPO_4 + 12 H_2O	1,o	g
Alanin	o,5	g
Acid.citric. + 1 H_2O	o,5	g
$MgSO_4$	o,8	g
Ferriammonsulfat	o,ol	g
Glycerin	3o,o	ccm
Aqua dest	looo	ml
Pron-Agar	14,o	g
pH	8,o	

Die Hauptstickstoffquelle war bei allen Medien Asparagin. Als zusätzliche Stickstoffquelle diente bei den von uns hergestellten Medien Alanin bzw. Histidin, das für fast alle Mykobakterien eine schlechte Kohlenstoff- und Stickstoffquelle ist, mit Ausnahme von M.smegmatis, das Histidin verwerten kann (BÖNICKE, 1964).

Zur Pufferung wurde sekundäres Natriumphosphat verwendet. Der Glyceringehalt lag innerhalb der für Mykobakterien gebräuchlichen Konzentration (2-6%).

Die Zusammensetzung der geprüften Nährböden unterschied sich vor allem durch die verschiedene Wasserstoffionenkonzentration; die pH-Werte für die geprüften Medien betrugen 6,8 (modifizierter Lockemann-Nährboden), 7,5 (Medium I) und 8,o (Medium II). FROMAN, WILL und BOGEN (1954) benutzten als erste Bordet-Gengou-Agar-Medium (Difco) zum Nachweis der Plaques. Sie betonen, dass dieses Medium die besten Ergebnisse in der Darstellung der Plaques ergibt. Dieses Medium wurde dann auch von anderen Untersuchern übernommen. SELLERS und RUNNALS (1961) benutzten für die Darstellung der Plaques einen Nährboden folgender Zusammensetzung:

Fleischbrühe (Difco)	25	g
Bordet-Gengou-Agar	12	g
Proteose (Difco)	lo	g
Glycerin	lo	ml
Aqua dest.	looo	ml

Andere Untersucher hingegen verwendeten in ihren Versuchen Dubos-Ölsäure-Albumin-Agar mit gutem Erfolg (REDMOND und CATER, 196o, HNATKO, 1953).

Von besonderer Bedeutung für die Grösse und Anzahl der Plaques scheint nach HNATKO (1952) die Konzentration des Agar im Medium zu sein. Am günstigsten soll nach ihm diejenige Agarkonzentration sein, bei der es nicht mehr zu einem Zerfliessen oder Zerbrechen des Mediums kommen kann. HNATKO stellte fest, dass ein Anstieg der Agar-Konzentration mit einem Abfall der Plaques-Zahl und -Grösse einhergeht. REDMOND und CATER (1960) konnten diese Ergebnisse bestätigen, indem sie fanden, dass sie in einem modifizierten Dubos-Ölsäure-Medium mit 1,1% Agar mehr und grössere Plaques erhielten als in dem gleichen Medium mit 1,5% Agar. Entsprechend war die Grösse der Plaques auf dem von uns untersuchten 2%igen Glycerin-Agar im Durchschnitt geringer als auf den anderen geprüften Nährböden.

Im Rahmen unserer Vergleichsversuche mit beiden Phagenstämmen sahen wir auf den verschiedenen Nährböden das in Tabelle 3 eingetragene Bild der Plaques.

Tabelle 3: Aussehen der Plaques in Abhängigkeit vom Nährmedium

Phage	Nährboden	Mykobakt. Stamm	Plaques		
			Grösse	Aussehen	Rand
B	2% Glyc.Agar	M.smegm.	1-3 mm	klar	verschwommen
	Sauton	SN 47	2-3 mm	verwischt	verschwommen
	Medium I	SN 47	2-4 mm	klar	verschwommen
	Medium II	SN 47	2-4 mm	klar	verschwommen
R	2% Glyc.Agar	M.lactic.	1-2 mm	klar	glatt
	Sauton	M.lactic.	1-2 mm	verwischt	glatt
	Medium I	M.lactic.	1-3 mm	klar	glatt
	Medium II	M.lactic.	1-3 mm	klar	glatt

Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich, waren Aussehen, Grösse und Begrenzung der Plaques in den auf beiden von uns zusammengestellten Nährböden gezüchteten Bakterienstämmen gleich. Auf unseren Nährböden waren die Plaques in der Regel etwas grösser als auf dem Lockemann-Medium (Tab.2), dem 2%igen Glycerin-Agar und dem Nährmedium nach Sauton. Da, wie die Versuche zeigten, kein Medium Vor-

teile in der Züchtung der einzelnen Bakterienstämme oder in Grösse, Aussehen und Begrenzung der Plaques bot, verwendeten wir für alle weiteren Versuche das modifizierte Lockemann-Medium.

2. Bestimmung des Phagenspektrums innerhalb der untersuchten Stämme

Das Wirtsspektrum des M.smegmatis-Phagen (B-Phage) und des M. lacticola-Phagen (R-Phage) wurde bei 16 Stämmen schnell wachsender Mykobakterienarten (M.smegmatis 7 Stämme; M.lacticola 1 Stamm; M.fortuitum 2 Stämme; M.phlei 4 Stämme; M.thamnopheos 2 Stämme) und gegen 9 Stämme langsam wachsender Mykobakterienarten (M.kansasii 3 Stämme; M.avium 2 Stämme; M.aquae 2 Stämme und M.marinum 2 Stämme) in der Agarschichtmethode, wie S. 7 beschrieben, getestet. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Wirtsspektrum des B- und R-Phagen

Stämme	Nr.	B-Phage angereichert über SN 47	R-Phage angereichert über M.lact.
M. smegm.	SN 1	+	+
	SN 7	+	+
	SN 8	+	+
	SN 1o	+	+
	SN 17	-	-
	SN 47	+	-
	F 21	+	+
M.lact.		-	+
M.fortuit.	SN 2o3	-	-
	SN 2o2	-	+
M.phlei	SN 1o1	-	-
	SN 1o9	-	+
	F 89	-	-
	M.Timoteo	-	-
M.thamnoph.			
	SN 12o1	-	+
	SN 12o2	-	-
M.kansas.	SN 5o1	-	-
	SN 515	-	-
	F 284	-	-
M. avium	SN 3o4	-	-
	SN 4o3 (Battey)	-	-
M. aquae	SN 6o1	-	-
	SN 7o3	-	-
M. marinum	SN 1254	-	-
	SN 13o1 (balnei)	-	-

+ = Bakterienstamm durch Phage lysiert
- = Bakterienstamm durch Phage nicht lysiert

Wie aus der tabellarischen Zusammenstellung ersichtlich, war der B-Phage nur gegen Mykobakterienstämme der Species M.smegmatis aktiv. Er lysierte 6 von 7 getesteten Stämmen. Im Gegensatz zu diesem speciesspezifischen Verhalten des B-Phagen lysierte der R-Phage neben seinem Wirtsstamm M.lacticola noch 5 M.smegmatis-Stämme, aber nicht den Wirtsstamm des B-Phagen (Stamm SN 47). Darüber hinaus erstreckte sich seine Aktivität noch auf die 3 weiteren schnell wachsenden Mykobakterienstämme, M.fortuitum, M.phlei und M.thamnopheos.

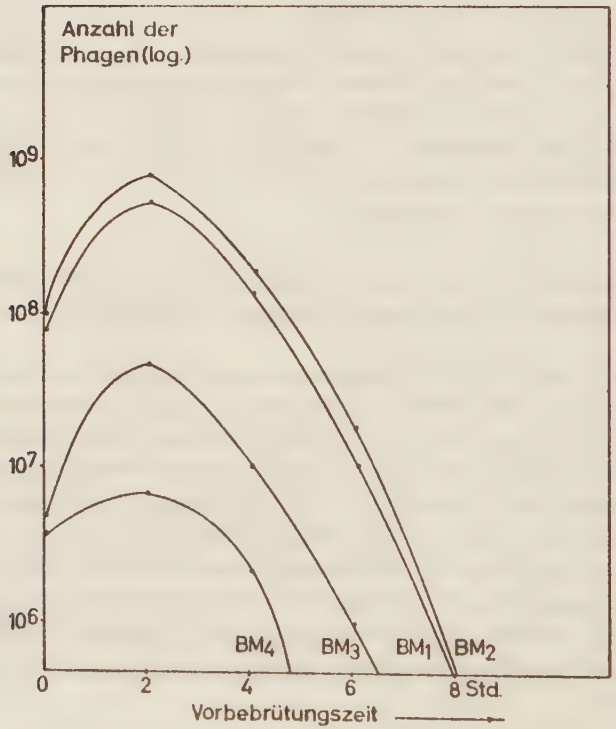
Somit besassen die beiden Phagen eine über ihren Wirtsstamm hinausgehende Aktivität, wobei das Spektrum des B-Phagen auf die von uns geprüften Stämme der gleichen Species begrenzt war, während der R-Phage auch Mykobakterienstämme anderer Species lysierte. Von insgesamt 25 geprüften schnell und langsam wachsenden Mykobakterienstämmen wurden vom B-Phagen 6 Stämme, vom R-Phagen 9 Stämme lysiert.

3. Abhängigkeit der Phagenvermehrung von der Bebrütungsdauer der Kultur des Wirtsstammes und der Keimzahl

Zur Ermittlung der zur Phagenanreicherung günstigsten Bebrütungszeit der Mykobakterienkulturen bei verschiedenen Beimpfungsmengen variierten wir in Vorversuchen die Bebrütungsdauer der Kulturen bei 37°C vor Zugabe der anzureichernden Phagen und die Keimzahl der Bakterien. 1 ml der Phagensuspensionen, die 1.10^6 B-Phagen- bzw. 3.10^6 R-Phagenpartikel/ml enthielten, wurde zu je 5 ml 2%iger Glycerinbouillon sofort nach Beimpfung mit 1 ml des jeweiligen Teststammes oder erst nach 2, 4, 6 oder 8 Stunden Bebrütungszeit zugegeben. Die Beimpfungsmengen der Bakterien betrugen jeweils 5.10^7/ml, 1.10^8/ml, $2{,}5.10^8$/ml und 5.10^8/ml.

Nach 16 Stunden Bebrütung der Bakterien-Phagenmischung bei 37°C, die zu einer vollständigen Aufhellung der Suspension führte, wurde der Phagentiter in der auf Seite 9 angegebenen Weise bestimmt. Unsere Versuchsergebnisse sind in Abb. 1 und 2 (S. 16 u. 17) getrennt für beide Phagenstämme zusammengestellt.

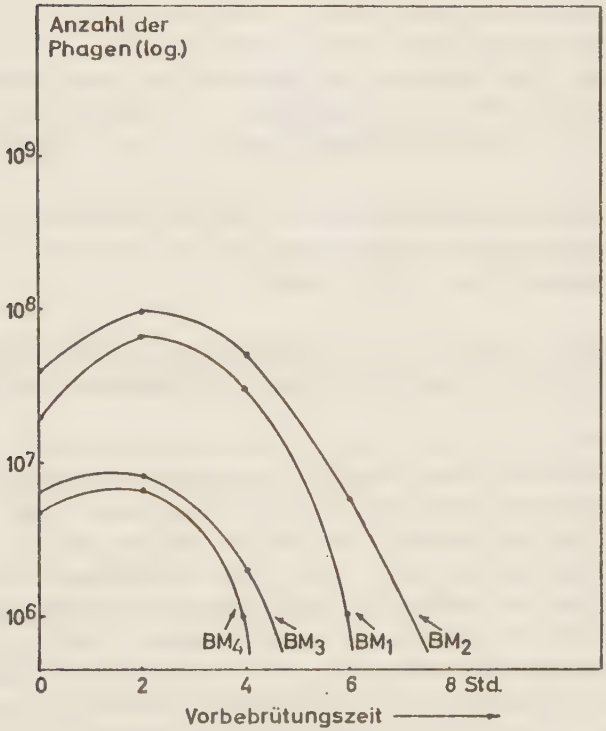
Abb.1: Abhängkeit der Vermehrung des B-Phagen von der Bebrütungsdauer der Kultur des Wirtsstammes und der Beimpfungsmenge.



BM = Beimpfungsmenge des Wirtsstammes SN 47

BM_1 = 5.10^7/ml
BM_2 = 1.10^8/ml
BM_3 = $2{,}5.10^8$/ml
BM_4 = 5.10^8/ml

Abb. 2: Abhängigkeit der Vermehrung des R-Phagen von der Bebrütungsdauer der Kultur des Wirtsstammes und der Beimpfungsmenge.



BM = Beimpfungsmenge des Wirtsstammes M.lacticola

BM_1 = 5.10^7/ml
BM_2 = 1.10^8/ml
BM_3 = $2,5.10^8$/ml
BM_4 = 5.10^8/ml

Wie aus den Abb. 1 und 2 ersichtlich ist, verhielten sich beide Phagen in der Anreicherung weitgehend gleich. Als günstigster Zeitpunkt für das Hinzufügen der Phagen zu den Bakterienkulturen wurde eine Vorbebrütungszeit von 2 Stunden bei einer optimalen Beimpfungsmenge der Kulturen von 1.10^8/ml ermittelt. Für den B-Phagen wurde bei einer Vorbebrütungszeit von 2 Stunden und einer Beimpfungsmenge von 1.10^8/ml ein Anstieg der Phagenpartikel von 1.10^6/ml auf 8.10^8/ml und für den R-Phagen von 3.10^6/ml auf 1.10^8/ml Phagenpartikel beobachtet. Bei sofortiger Zugabe der Phagen ohne Vorbebrütung der Kulturen, bei einer Vorbebrütungszeit von 4, 6 und 8 Stunden stieg dagegen die Anzahl der Phagenpartikel geringer an. Diese Beobachtung gilt für alle vier Beimpfungsmengen. Als ungünstigste Beimpfungsmenge für die Phagenanreicherung wurden 5.10^8 Keime/ml ermittelt.

Das Optimum für die Anreicherung lag also bei beiden Phagen bei einer Vorbebrütungszeit der Kulturen von 2 Stunden und einer Beimpfungsmenge von 1.10^8 Keimen/ml.

4. Inaktivierung der B- und R-Phagen in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Suspensionsmediums

Aufgabe dieser Versuche war es, das Verhalten des B- und R-Phagen bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen des Suspensionsmediums zu prüfen. Da es bei der Verwendung von Glycerinbouillon als Suspensionsmittel für die Phagen bei einer pH-Einstellung von 3,o bzw. 4,o zu einer Eiweissausflockung kam, die bei der entsprechend eingestellten Proteoselösung ausblieb, verwendeten wir für diesen und die Versuche 5 und 7 Proteoselösung (Proteose Peptone Nr. 3, Difco). Diese wurde in einzelne Portionen abgefüllt, die vor der Sterilisation mit dem Universal-pH-Meter 22 (Radiometer Kopenhagen) auf pH-Werte von 3,o - 11,o eingestellt wurden, indem die Lösung mit Säure bzw. Lauge versetzt wurde. Nach der Sterilisation wurde der erforderliche pH-Wert, soweit er sich verändert hatte, erneut eingestellt. Die B- bzw. R-Phagen wurden in einer Endkonzentration von 7.10^8 bzw. 6.10^7 Phagenpartikel/ml zugegeben. Nach 3, 6, 24, 48 und 5oo Stunden Einwirkungszeit bei +4°C wurde 1 ml der Phagensuspension

aus den verschlossenen Reagenzgläsern herauspipettiert und die Anzahl der noch nachweisbaren Phagenpartikel mit der Schichtmethode (S. 7) bestimmt. In gleicher Versuchsanordnung wurde eine Phagensuspension in 2%iger Glycerinbouillon, die auf den pH-Wert von 7,9 eingestellt war, geprüft. Aus je drei gleichen Versuchsreihen wurden die Mittelwerte in Abb. 3 u. 4 aufgezeichnet. Die Ergebnisse der in Abb. 3 und 4 (S. 2o u. 21) dargestellten Versuchsreihen sind in Tabelle 5 (S. 22) zusammengestellt. Der Tabelle ist die Streuung der drei Versuchsreihen zu entnehmen.

Abb. 3: Inaktivierung des B-Phagen in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Suspensionsmediums.

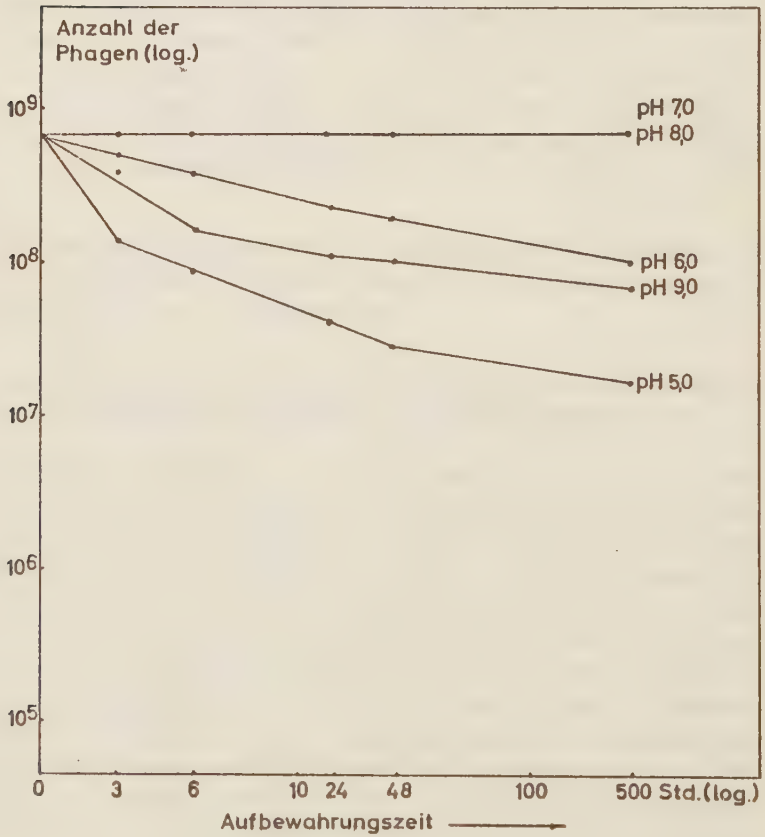


Abb. 4: Inaktivierung des R-Phagen in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Suspensionsmediums.

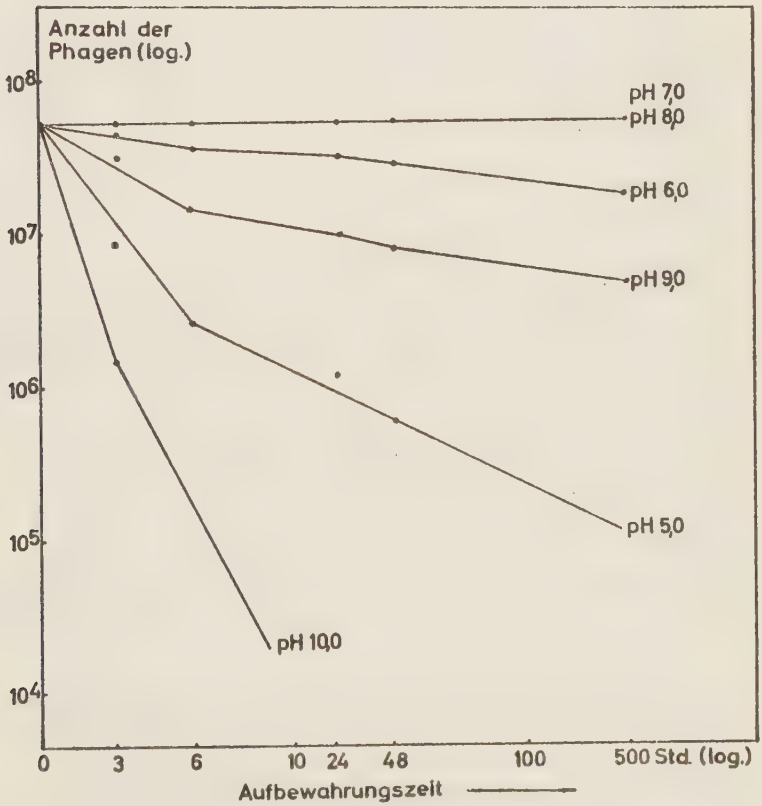


Tabelle 5: Inaktivierung des B- und R-Phagen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Suspensionsmediums

Einwirkungszeit in Stunden	Phage	Zahl der nicht inaktivierten Phagenpartikel in Prozent pH-Werte der Proteosebouillon																			
		3		4		5		6		7-8		9		10		11					
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
3	B	o	o	o	o	20,4 20,7 21,o	20,7	75,1 76,3 77,8	76,4	loo	loo	56,9 57,9 6o,7	58,5	o	o	o	o				
	R	o	o	o	o	14,4 16,9 17,5	16,2	81,5 85,o 87,6	85,o	loo	loo	58,6 6o,o 66,6	6o,8	1,6 2,3 2,8	2,3	o	o				
6	B	o	o	o	o	12,8 13,5 14,o	13,5	56,2 57,3 57,5	57,1	loo	loo	22,9 26,o 26,4	26,1	o	o	o	o				
	R	o	o	o	o	4,5 5,1 5,7	5,2	66,5 68,1 72,7	69,1	loo	loo	24,1 27,5 28,2	26,6	o	o	o	o				
24	B	o	o	o	o	5,8 6,9 7,9	6,5	32,o 33,7 35,8	33,5	loo	loo	15,2 17,6 19,2	17,5	o	o	o	o				
	R	o	o	o	o	1,1 1,5 3,4	2,o	52,2 55,4 6o,9	59,1	loo	loo	14,o 15,2 23,3	17,5	o	o	o	o				
48	B	o	o	o	o	4,1 4,3 4,8	4,4	26,9 27,7 28,8	27,8	loo	loo	12,8 13,9 16,4	14,7	o	o	o	o				
	R	o	o	o	o	0,8 0,8 2,o	1,2	45,1 48,8 51,5	48,2	loo	loo	12,5 14,5 16,5	14,5	o	o	o	o				
500	B	o	o	o	o	2,1 2,5 3,2	2,6	13,2 14,6 15,3	14,7	loo	loo	9,1 1o,2 1o,7	1o,o	o	o	o	o				
	R	o	o	o	o	o	o	31,o 31,1 32,1	34,o	loo	loo	6,4 9,1 11,o	9,5	o	o	o	o				

a = gemessene Einzelwerte
b = Mittelwerte

Zusammenfassend lässt sich aus den Versuchen zur Frage der Inaktivierung der Phagen in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration folgendes sagen:

Die pH-Werte 7,o und 8,o der Protoosebouillon und ein pH-Wert von 7,9 der 2%igen Glycerinbouillon führten innerhalb von 5oo Stunden zu keiner Inaktivierung der lytischen Eigenschaften beider Phagen. Die pH-Werte 3,o, 4,o und 11,o liessen nach 3 Stunden Einwirkungszeit keine aktiven B-bzw. R-Phagenpartikel mehr nachweisen, ausserdem inaktivierte die B-Phagensuspension eine pH 1o - Einstellung in dieser Zeit.

Bei pH 5,o waren nach 3 Stunden noch 2o,7% aktive B-bzw. 16,2% R-Phagenteilchen vorhanden, nach 5oo Stunden 2,6% bzw. o%. Eine Inaktivierung der Phagen war auch für die pH-Werte 6,o und 9,o festzustellen. Die B- bzw. R-Phagen waren nach 3 Stunden durch pH 6,o auf 76,4% bzw. 85,o%, nach 5oo Stunden auf 14,7% bzw. 34,o%, durch pH 9,o nach 3 Stunden auf 58,5% bzw. 6o,8% und nach 5oo Stunden auf 1o,o% bzw. 9,5% aktiver Partikel gesunken. Vergleicht man die Inaktivierbarkeit der B- und R-Phagen durch Säuerung und Alkalisierung des Suspensionsmediums, so zeigt sich für beide Phagen im sauren Bereich eine stärkere Inaktivierung als im alkalischen. Ausserdem sind bei den pH-Werten 6,o und 9,o nur geringe Unterschiede in der Inaktivierung des B- und R-Phagen festzustellen. Gegen pH 5,o ist der B-Phage und gegen 1o,o der R-Phage resistenter.

Aus den Versuchsergebnissen ist zu entnehmen, dass zur Phagenaufbewahrung Proteose- bzw. Glycerinbouillon mit pH 7,o - 8,o geeignet sind. Bei stärkerer Alkalisierung nimmt die Zahl der Phagenpartikel in Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkung beträchtlich ab.

5. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration einer Mykobakterienkultur auf die Vermehrung der B- und R-Phagen

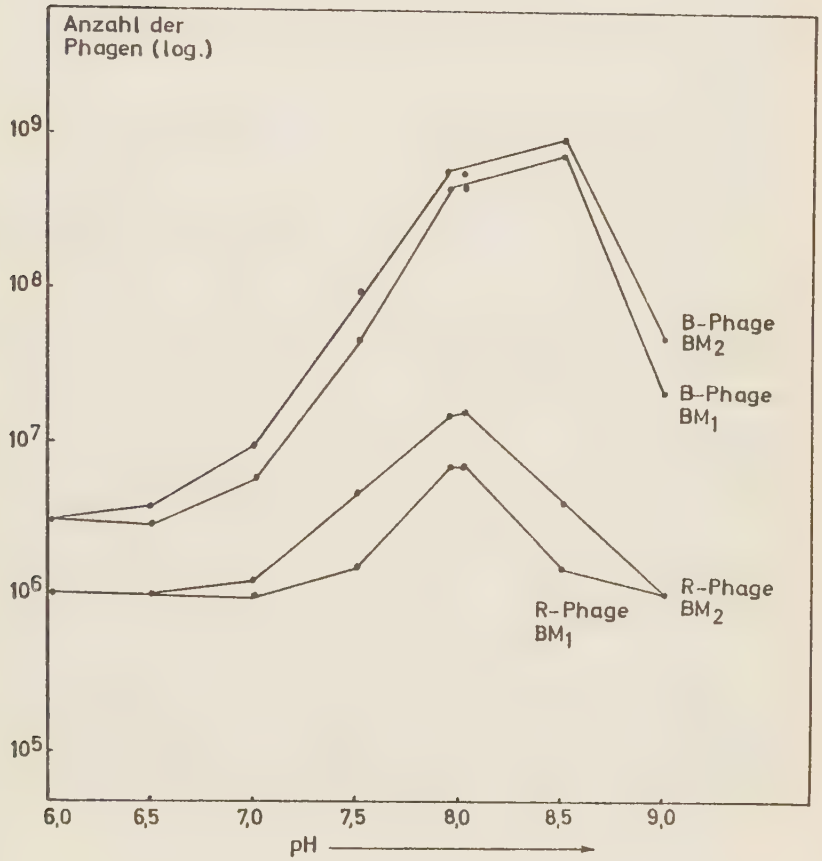
Aufgabe dieser Versuche war es, eine evtl. Beeinflussung der Phagenvermehrung durch Änderung des pH-Wertes in der zur Keimzüchtung verwendeten 2%igen Glycerinbouillon festzustellen. Es

wurde somit nicht die pH-Empfindlichkeit der Phagen in einem bestimmten Milieu, wie z.B. einer NaCl-Lösung oder einem Nährmedium, sondern die Abhängigkeit der Phagenvermehrung in Bakterienkulturen mit unterschiedlichen pH-Werten des flüssigen Nährmediums bestimmt.

Wie in Versuch 3 (S. 15) wurden die Phagen einer 2 Stunden bebrüteten Bakteriensuspension der Stämme M.smegmatis SN 47 bzw. M.lacticola zugegeben. Die Beimpfungsmenge betrug wieder 5.10^7 und 1.10^8 Keime/ml für die M.smegmatis - bzw. M.lacticola-Kultur in der Menge von 1 ml. Der in den einzelnen Kulturverfahren erforderliche pH-Wert von 6,o, 7,o, 8,o, 8,5 und 9,o wurde wieder mit dem Universal-pH-Meter 22 (Radiometer Kopenhagen) durch Hinzufügen von Säure bzw. Lauge vor Zugabe der Bakteriensuspensionen eingestellt. Die Kontrollen der M.smegmatis SN 47 - und M.lacticola-Kulturen ohne Phagen hatten einen pH-Wert von 7,9.

Aus drei Versuchsreichen wurden die Mittelwerte der Einzelergebnisse in Abb. 5 aufgezeichnet.

Abb. 5: Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration einer Mykobakterienkultur auf die Vermehrung des B- und R-Phagen.



BM = Beimpfungsmenge des Wirtsstammes SN 47 bzw. M. lacticol

BM_1 = 5.10^7/ml

BM_2 = 1.10^8/ml

Wie aus Abb. 5 (S. 25) ersichtlich, war bei einer Ausgangskonzentration der Phagen- Bakteriensuspension mit $1.1o^6$ bzw. $3.1o^6$ Phagenpartikeln/ml und der Beimpfungsmenge $5.1o^7$ bzw. $1.1o^8$ Keime/ml während der Bebrütungsdauer der Kulturen von 16 Stunden eine Phagenanreicherung vor allem im pH-Bereich von 7,o - 8,o (R-Phage) bzw. 7,o - 8,5 (B-Phage) der Glycerinbouillon-Kulturen festzustellen.

6. Temperaturempfindlichkeit der B- und R-Phagen

In diesen Versuchen wurde das Verhalten der B- und R-Phagen in Abhängigkeit von verschiedenen Temperaturen und Einwirkungszeiten geprüft.

Methodisch wurde so vorgegangen, dass Suspensionen der B- und R-Phagen in 2%iger Glycerinbouillon (pH 7,9) mit $7.1o^8$ und $6.1o^7$ Partikeln/ml im Wasserbad Temperaturen von 54°, 56°, 6o°, 65°, 7o° und 75°C ausgesetzt wurden. Die Einwirkungszeiten betrugen für jede Temperatur 5, 1o, 15, 2o, 3o, 45 und 6o Minuten. Nach dieser Zeit wurde jedem Röhrchen 1 ml der Phagensuspension entnommen und zur Durchführung des Plattierungsschrittes zusammen mit 1 Tropfen Bakteriensuspension und 2,5 ml o,7%igem Weichagar auf Petrischalen mit Lockemann-Nährmedien übertragen. Nach Bebrütung der Kulturen 24 - 48 Stunden bei 37°C erfolgte die Auszählung der Plaques. Als Testkeime dienten uns wieder M.smegmatis und M.lacticola. Die Mittelwerte aus je drei gleichen Versuchsreichen mit den Phagen B und R wurden als Ergebnisse dieser Untersuchungen in Abb. 6 und 7 (S. 27 u. 28) graphisch dargestellt. Aus Tab. 6 ist die Streuung der Werte in den drei Versuchsreihen ersichtlich.

Abb. 6: Temperaturempfindlichkeit des B-Phagen.

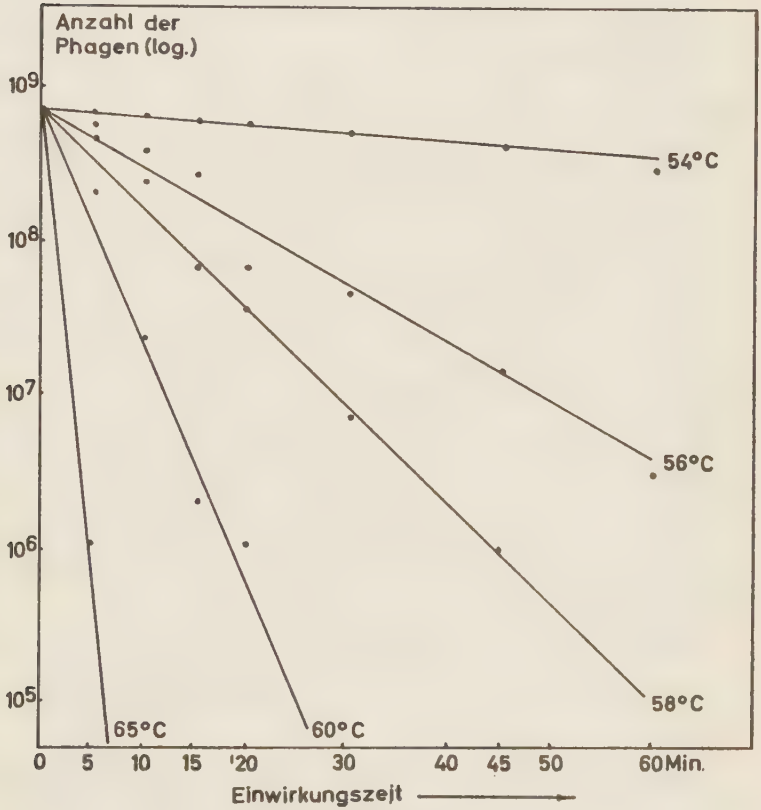


Abb.7: Temperaturempfindlichkeit des R-Phagen.

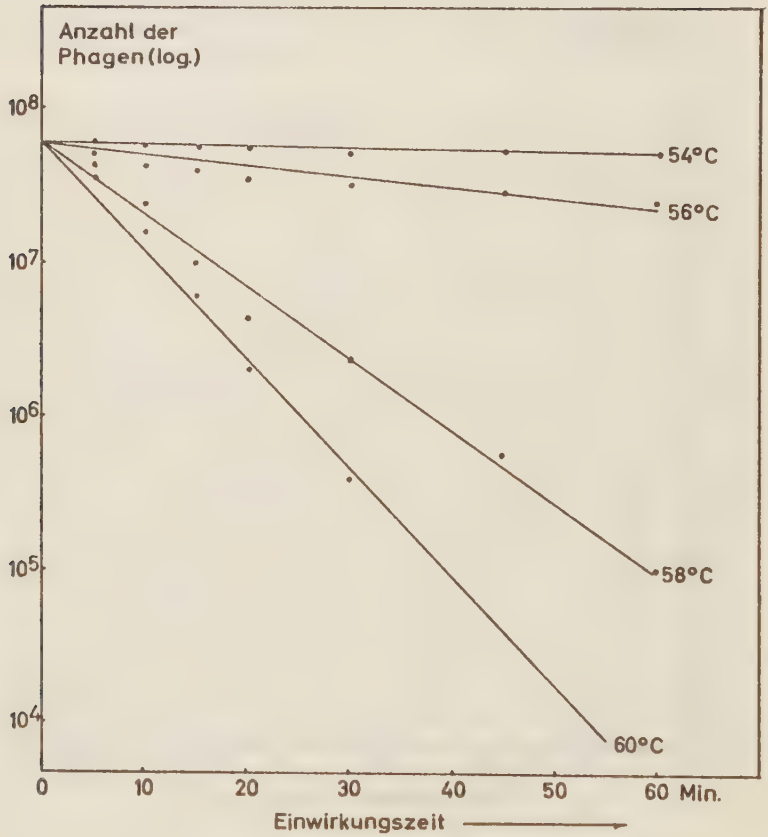


Tabelle 6: Thermoinaktivierung der B- und R-Phagen in Glycerinbouillon

Einwirkungszeit in Minuten	Phage	Zahl der nicht inaktivierten im Impfmittel in Prozent											
		Einwirkungstemperatur in °C											
		54		56		58		60		65		70-75	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5	B	92,0 92,4 92,8	92,4	68,1 62,4 68,1	62,2	46,1 46,7 50,1	45,6	26,8 29,0 30,2	28,5	0 0,1 0,2	0,1	0	0
	R	99,1 99,9 99,1	99,9	80,1 83,9 84,9	83,5	69,0 70,5 74,0	71,1	61,0 65,6 63,5	65,3	0	0	0	0
10	B	88,0 90,1	89,0	47,8 46,7 51,0	47,9	35,5 35,5 36,3	36,2	2,2 3,5 4,3	3,3	0	0	0	0
	R	97,5 99,2 99,6	99,1	73,0 75,5 78,5	75,0	37,5 41,5 43,2	40,0	25,0 27,0 30,5	27,5	0	0	0	0
15	B	82,0 82,1 85,2	83,1	30,4 33,1 34,0	32,5	8,5 8,6 9,4	8,6	0,1 0,1 0,2	0,3	0	0	0	0
	R	97,5 98,5 98,9	98,2	69,4 69,4 70,3	68,3	17,5 18,2 25,1	20,2	8,1 8,3 9,9	8,1	0	0	0	0
20	B	77,5 78,6 79,5	78,2	8,9 9,1 9,9	9,3	3,0 5,1 8,5	4,9	0 0 0,4	0,1	0	0	0	0
	R	76,1 88,5 91,5	92,2	66,6 92,2 67,2	80,8	7,0 7,9 12,4	9,1	1,0 4,2 4,7	3,3	0	0	0	0
30	B	68,4 70,6 72,4	71,8	5,5 6,9 7,0	6,4	0,1 0,1 2,5	0,9	0	0	0	0	0	0
	R	92,5 94,1 95,3	95,6	55,0 55,1 57,2	55,8	2,0 4,0 6,2	4,1	0,6 0,8 1,2	0,8	0	0	0	0
45	B	5,2 60,1 61,7	60,0	1,0 1,1 1,5	1,2	0,1 0,2 0,4	0,2	0	0	0	0	0	0
	R	91,5 96,5 98,0	95,0	43,9 51,1 52,3	49,1	0,1 0,4 1,3	0,8	0	0	0	0	0	0
60	B	38,3 38,3 42,5	39,4	0,1 0,4 0,7	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	87,0 88,5 92,3	91,6	36,1 39,1 45,7	40,9	0,1 0,1 0,5	0,2	0	0	0	0	0	0

a = gemessene Einzelwerte
b = Mittelwerte

Unsere Versuche, den B- und R-Phagen durch Wärme zu inaktivieren, führten, wie aus Abb. 6 und 7 (S. 27 u. 28) und Tab. 6 (S. 29) hervorgeht, zu folgenden Ergebnissen:

Beide Phagen wurden innerhalb 5 Minuten in Suspensionen, die Temperaturen von 7o° und 75°C ausgesetzt waren, inaktiviert. Den R-Phagen inaktivierte in derselben Zeit auch eine Temperatur von 65°C.

Eine Temperatur von 6o°C inaktivierte in lo Minuten 96,7% der B-Phagen- und 72,5% der R-Phagen-Partikel. In 3o Minuten waren die B- und in 45 Minuten die R-Phagensuspension vollständig inaktiviert.

Eine Temperatur von 58°C führte innerhalb lo Minuten zu einer Reduzierung nachweisbarer B- bzw. R-Phagenteilchen auf 36,2% bzw. 4o,o% und innerhalb von 3o Minuten auf o,9% bzw. 4,1%. Nach 6o Minuten waren keine aktiven B- bzw. 0,2% R-Phagenpartikel vorhanden.

Durch eine Temperatur von 56°C wurden die B- bzw. R-Phagenteilchen in lo Minuten auf 47,9% bzw. 75,o%, in 3o Minuten auf 6,4% bzw. 55,8% und in 6o Minuten auf o,4% bzw. 4o,9% reduziert. Eine lo Minuten lange Erhitzung der B- bzw. R-Phagensuspension auf 54°C bewirkte eine Inaktivierung auf 89,o% bzw. 99,1%, eine halbstündige Erhitzung auf 71,8% bzw. 96,6% und eine einstündige auf 39,4% bzw. 91,6% aktiver Partikel.

Ein Vergleich der Inaktivierbarkeit beider Phagenstämme zeigt, dass der R-Phage gegenüber Temperaturen von 6o°C bis 54°C resistenter als der B-Phage ist.

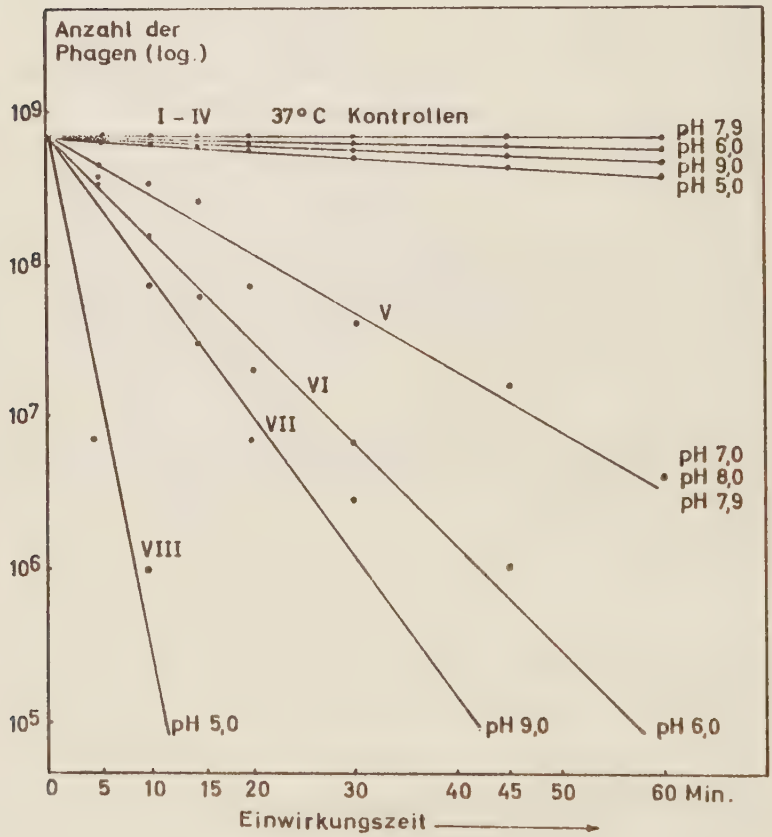
Wird die Anzahl der nach einer bestimmten Einwirkungszeit nicht inaktivierten Phagenpartikel logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, so weisen die zu einer Geraden verbundenen Werte auf den linearen Verlauf der Phageninaktivierung hin.

7. Thermoresistenz der B- und R-Phagen in Proteoselösung mit verschiedenem pH als Suspensionsmittel

Nachdem die vorausgegangenen Versuche (Versuche 4 u. 6) gezeigt hatten, dass eine Säuerung und Alkalisierung der Proteoselösung

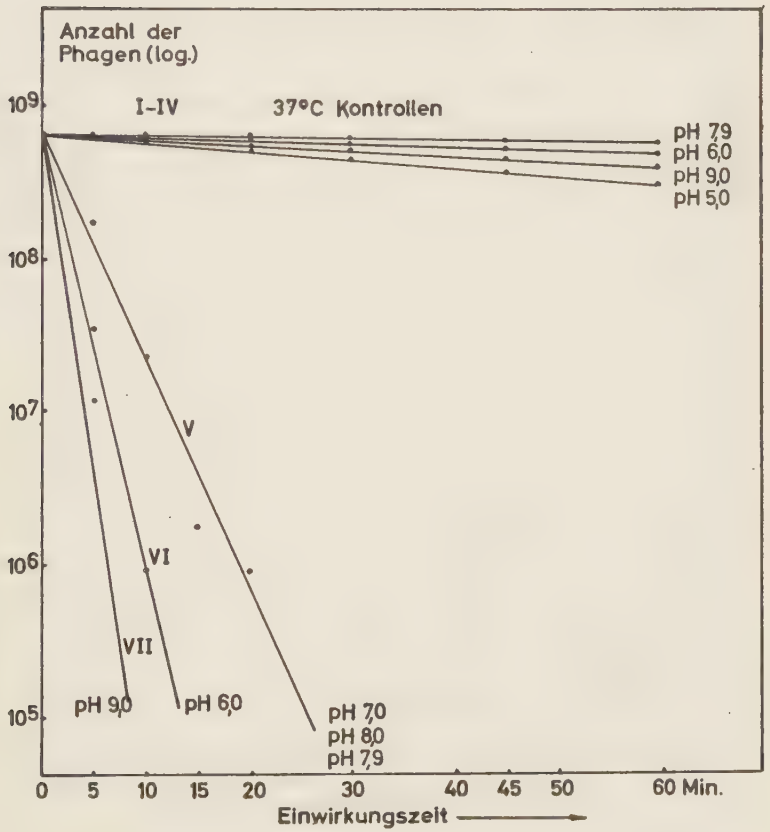
als Phagensuspensionsmittel und ihre zunehmende Erwärmung zu einer Beschleunigung der Inaktivierung führen, wurde noch das Verhalten der beiden Phagenstämme bei wechselndem pH und verschiedener Temperatur des Suspensionsmittels bestimmt. Bei diesen Untersuchungen wurde wie bei Versuch 4 (S. 18) und Versuch 6 (S. 26) vorgegangen. Die einzelnen Gläschen mit Proteoselösungen von pH 5,o bis 9,o wurden mit dem B- bzw. R-Phagen in einer Endkonzentration von $7.1o^8$ bzw. $6.1o^7$ Phagenpartikel/ml beschickt und anschliessend im Wasserbad Temperaturen von 56°C und 6o°C über 5, 1o, 15, 2o, 3o, 45 und 6o Minuten ausgesetzt. Der Prozentsatz der nicht inaktivierten Phagenpartikel wurde mit der Schichtmethode (S. 7) bestimmt. In der gleichen Versuchsreihe wurden als Kontrollen die Phagenstämme in Proteoselösungen mit pH 5,o - 9,o suspendiert und Temperaturen von 37°C im Wasserbad ausgesetzt. Als weitere Kontrolle diente uns eine Glycerinbouillon mit pH 7,9, in der die Phagenstämme auf eine Temperatur von 56°C und 6o°C zur Bestimmung des Titerabfalls erhitzt wurden. Wie bei Versuch 6 (S. 26) wurden auch hier die Mittelwerte aus je drei gleichen Versuchsreihen aufgezeichnet, der Tabelle 7 (S. 36) ist die Streuung der Einzelwerte in den drei Versuchsreihen zu entnehmen.

Abb. 8: Thermoresistenz des B-Phagen in Proteoselösung mit verschiedenem pH des Suspensionsmittels.



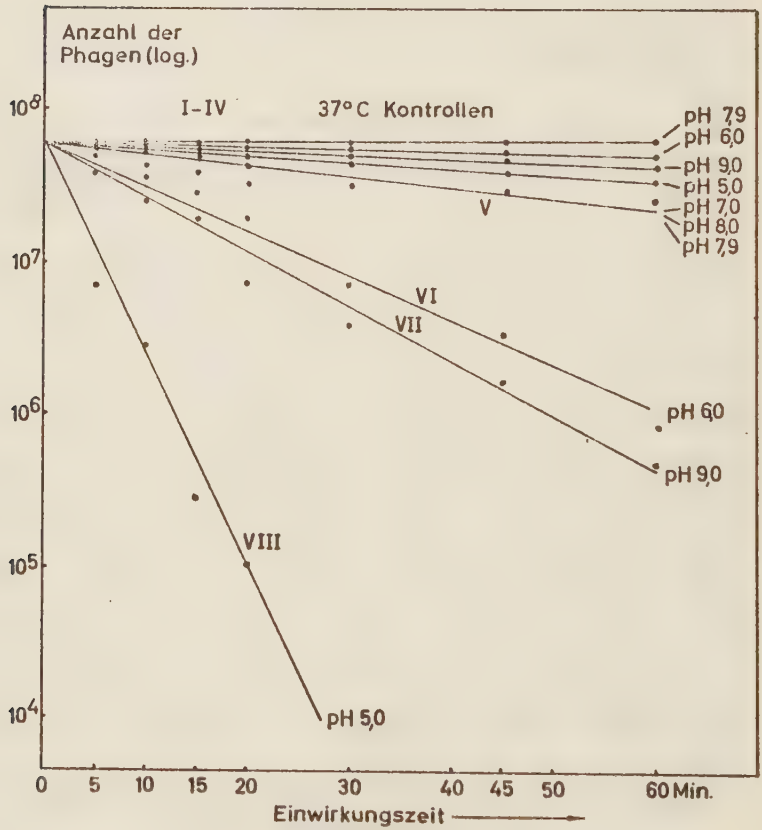
Einwirkungstemperatur: I - IV 37°C
Einwirkungstemperatur: V - VIII 56°C

Abb. 9: Thermoresistenz des B-Phagen in Proteoselösung mit verschiedenem pH des Suspensionsmittels.



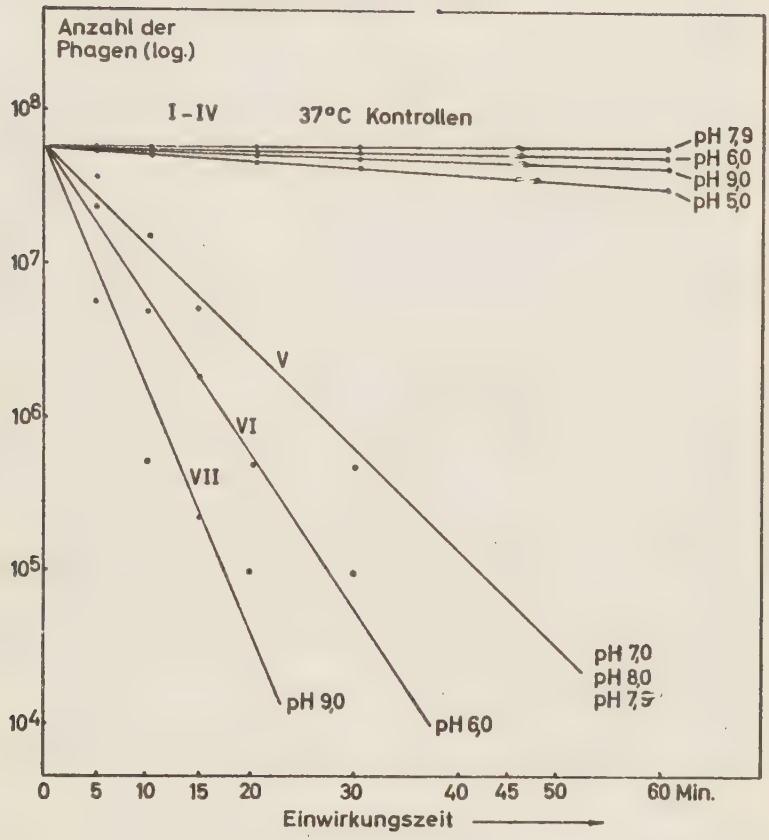
Einwirkungstemperatur: I - IV 37°C
Einwirkungstemperatur: V - VII 60°C

Abb. 10: Thermoresistenz des R-Phagen in Proteoselösung mit verschiedenem pH des Suspensionsmittels.



Einwirkungstemperatur: I - IV 37°C
Einwirkungstemperatur: V - VIII 56°C

Abb. 11: Thermoresistenz der R-Phagen in Proteoselösung mit verschiedenem pH des Suspensionsmittels.



Einwirkungstemperatur: I - IV 37°C
Einwirkungstemperatur: V - VII 60°C

Tabelle 7: Thermoinaktivierung der B- und R-Phagen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Suspensionsmediums

Einwirkungszeit in Minuten	Phage	Zahl der nicht inaktivierten Phagenpartikel in Prozent Einwirkungstemperatur in °C 56								60							
		pH-Werte der Proteosebouillon															
		5		6		7-8		9		5		6		7-8		9	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5	B	0,2 0,4 2,4	1,0	58,0 59,9 61,7	59,2	59,9 60,3 66,6	62,2	58,2 59,7 53,7	59,2	0	0	3,8 5,7 8,0	5,8	25,8 26,8 27,1	26,3	1,0 1,0 3,8	1,9
	R	10,0 11,9 12,9	11,6	78,7 81,4 85,1	81,6	80,1 84,3 85,5	83,3	69,8 70,6 70,6	70,0	0	0	45,5 47,3 49,7	47,5	62,1 69,1 69,9	69,1	9,0 9,6 10,5	9,8
10	B	0 0,1 0,3	0,1	20,0 20,3 22,9	21,4	45,9 46,1 49,7	47,9	9,6 10,8 11,7	10,7	0	0	0,1 0,1 0,2	0,1	2,2 2,9 4,3	3,3	0	0
	R	3,0 5,3 6,1	5,0	65,4 66,8 67,7	66,6	74,0 75,1 75,9	75,0	45,5 47,1 47,2	46,6	0	0	8,1 8,9 10,3	9,1	27,0 27,4 28,3	27,5	0,1 0,9 1,5	0,6
15	B	0	0	3,0 3,4 9,1	3,5	30,0 33,5 34,2	32,5	3,0 4,4 4,9	4,1	0	0	0	0	0,2 0,2 0,5	0,3	0	0
	R	0,1 0,1 1,3	0,5	49,5 50,1 50,4	50,0	67,5 67,5 70,1	68,3	30,1 30,8 32,5	31,1	0	0	2,7 2,9 4,2	3,5	7,9 8,0 9,4	8,1	0,1 0,2 0,7	0,3
20	B	0	0	1,9 3,5 3,6	3,0	9,0 9,9 10,0	9,3	0,5 1,0 1,6	1,0	0	0	0	0	0 0,1 0,4	0,1	0	0
	R	0	0	17,5 20,5 22,1	20,0	53,0 60,6 62,0	60,8	8,5 10,5 11,0	10,0	0	0	0,4 1,0 1,0	0,8	3,0 3,1 3,6	3,3	0 0,1 0,3	0,1
30	B	0	0	0,3 2,7 9,5	0,9	6,2 7,1 52,5	6,4	0,3 0,4 6,0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	10,3 10,5	10,1	55,2 59,4	55,8	6,2 7,7	6,6	0	0	0 0,1 0,3	0,1	0,3 0,9 1,2	0,8	0	0
45	B	0	0	0 0,1 0,2	0,1	0,5 1,2 1,7	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	4,0 5,0 6,3	5,1	47,3 49,3 50,7	49,1	2,0 3,5 3,6	3,0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	B	0	0	0	0	0,1 0,5 0,9	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	1,0 1,0 1,2	1,3	40,5 42,4 44,3	42,5	0,1 0,3 1,6	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0

a = gemessene Einzelwerte
b = Mittelwerte

Unsere Versuche, die B- und R-Phagen in Proteoselösungen mit verschiedenen pH-Werten bei wechselnden Temperaturen zu inaktivieren, führten, wie aus Abb. 8-11 (S. 32-35) und Tabelle 7 (S. 36) ersichtlich, zu folgenden Ergebnissen:

Eine Temperatur von 37°C verminderte die Zahl der aktiven B- und R-Phagenteilchen in der auf pH 7-8 eingestellten Suspension auch nach 6o Minuten nicht. pH-Werte von 5,o, 6,o und 9,o liessen die B-bzw. R-Phagenpartikel innerhalb 6o Minuten auf 76,2% bzw. 71,8%, 93,2% bzw. 95,1% und 87,6% bzw. 86,2% absinken. Eine Temperatur von 56°C führte innerhalb von 1o Minuten zu einer Reduzierung aktiver B- bzw. R-Phagenpartikel in einer Suspensionslösung von pH 5,o auf o,1% bzw. 5,o%, von pH 6,o auf 21,4% bzw. 66,6% und von pH 9,o auf 1o,7% bzw. 46,6%. Eine Einwirkung dieser Temperatur inaktivierte in 15 Minuten (pH 5,o), in 6o Minuten (pH 6,o) und in 45 Minuten (pH 9,o) die B-Phagensuspension und in 2o Minuten (pH 5,o) die R-Phagensuspension vollständig.

Eine Erhitzung der B- bzw. R-Phagen auf 6o°C bewirkte in 5 Minuten (pH 5,o), in 15 Minuten bzw. 45 Minuten (pH 6,o) und in 1o bzw. 3o Minuten (pH 9,o) eine vollständige Inaktivierung. Aus den Abb. 8-11 (S. 32-35) und aus der Tabelle 7 (S. 36) geht hervor, dass zwei Faktoren an der Inaktivierung der Phagen beteiligt sind, die Wärmeeinwirkung und die Säuerung oder Alkalisierung der Phagensuspensionslösung. Das Ausmass der Inaktivierung aktiver Teilchen in Suspensionslösungen von pH 5,o, 6,o und 9,o ist bei der Einwirkung der Temperaturen von 56°C und 6o°C grösser als bei der Einwirkung auf Suspensionslösungen mit pH 7-8 (Thermoinaktivierung Abb. 6 u. 7, S. 27 u. 28, und Tabelle 6, S. 29). Ausserdem wird eine geringere Zahl der Phagenpartikel in Suspensionen von pH 5,o, 6,o und 9,o durch eine Temperatur von 37°C inaktiviert.

Während eine 1-stündige Erhitzung einer neutralen Suspensionslösung auf 56°C die aktiven B-Phagenpartikel um 99,6% und eine 1-stündige Einwirkung eines pH-Wertes von 6,o der Suspensionslösung um 6,8% inaktivierten, so führten in dieser Zeit eine gleichzeitige Erhitzung auf 56°C und eine Säuerung der Suspensionslösung (pH 6,o) zu einer vollständigen Inaktivierung.

Eine Temperatur von 60°C liess nach 15 Minuten noch 0,34%, eine pH-Einstellung von 6,0 bei 37°C noch 98,3% aktive B-Phagenteilchen nachweisen, dagegen bewirkte eine 1/4-stündige Erhitzung der Phagensuspensionslösung mit pH 6,0 auf 60°C eine vollständige Inaktivierung.

Ein Vergleich der Ergebnisse lässt ein ähnliches Verhalten der beiden Phagenstämme gegenüber Wärme bzw. Säuerung oder Alkalisierung des Suspensionsmediums feststellen. Beide Phagen wurden in Suspensionen mit pH 5,0, 6,0 und 9,0 bei 56°C und 60°C in höherem Prozentsatz inaktiviert als bei alleiniger Einwirkung wechselnder Temperaturen und Wasserstoffionenkonzentrationen. Den stärksten inaktivierenden Einfluss hatte bei gleichzeitiger Wärmewirkung von 60°C die Säuerung des Suspensionsmediums auf pH 5,0. Wie bei den Untersuchungen über die alleinige Wärmeinaktivierung (Abb. 6 u. 7, S. 27 u. 28) oder die pH-Verschiebung in den sauren und alkalischen Bereich (Abb. 3 u. 4, S. 20 u. 21) zeigen die Inaktivierungskurven einen linearen Verlauf.

8. Inaktivierung der B- und R-Phagen durch chemische Mittel

Es ist bekannt, dass sich verschiedene Phagenarten unterschiedlich gegenüber denselben Mitteln, wie z.B. Phenol, Formalin, Chloroform und Merthiolat verhalten (CALLOW, 1927, LEGROUX, 1932, TEMPE und UHLHORN, 1932). Diesbezügliche Untersuchungen lagen für Mykobakteriophagen bis auf die Untersuchungen von PIGUET (1960) und REDMOND (1963) über die Inaktivierung durch Chloroform nicht vor, so dass wir die inaktivierende Wirkung von Phenol und Formalin in 0,25 und 0,50%iger bzw. von Chloroform in 1,0 und 10%iger Konzentration untersuchten. Ausserdem prüften wir Merthiolat in 0,01%iger Konzentration auf seine Mykobakteriophagen inaktivierende Wirkung.

Methodisch wurde folgendermassen vorgegangen:

Zur Herstellung einer Phagensuspension in einer 2%igen Glycerinbouillon mit 0,25% Phenolgehalt wurde 0,25 ml Phenol mit 9,75 ml NaCl-Lösung gemischt. 1 ml der so erhaltenen 2,5%igen Phenol-

lösung und 1 ml einer konzentrierten Phagensuspension wurden dann in 8 ml Glycerinbouillon übertragen. Dieser Ansatz führte zu einer Verdünnung der konzentrierten Phagensuspension von 1 : 1o in o,25%igem Phenol. Nach einer Einwirkungszeit von 1, 3, 6 und 24 Stunden, 2, 4, 14 und 3o Tagen und 2 und 3 Monaten wurde die B-Phagensuspension in Glycerinbouillon auf $1o^{-6}$ und die R-Phagensuspension auf $1o^{-5}$ weiter verdünnt. Die Endverdünnung für das o,25%ige Phenol lag somit beim B-Phagen bei o,ooooo25% und beim R-Phagen bei o,oooo25%. Die Versuche mit o,5%igem Phenol, o,25%igem und o,5%igem Formalin, 1%igem und 1o%igem Chloroform wurden in gleicher Weise durchgeführt.

Zur Herstellung einer Phagensuspension in einer 2%igen Glycerinbouillon mit o,o1%igem Merthiolat wurden von dem in Glycerinbouillon auf $1o^{-3}$ verdünnten Merthiolat 1 ml und 1 ml einer konzentrierten Phagensuspension in 8 ml Glycerinbouillon übertragen. Die Merthiolatkonzentration betrug demnach o,o1% bei einer Phagenverdünnung von $1o^{-1}$. Wiederum wurde nach Ablauf der obengenannten Einwirkungszeiten die Phagensuspension bis zum Gebrauchstiter weiter verdünnt und dann die Anzahl der Plaques mit der Agarschichtmethode festgestellt. Die Suspensionen wurden in mit Gummistopfen verschlossenen Reagenzgläsern im Kühlschrank bei + 4°C aufbewahrt.

In den Suspensionen mit 1o%igem Chloroform bildete sich ein Chloroformbodensatz, so dass die darüber stehende Schicht für den Plattierungsschritt sehr vorsichtig abpipettiert werden musste. In dieser Versuchsreihe wurden zur Kontrolle des "spontanen" Phagentiterabfalles nach den jeweiligen Einwirkungszeiten die Anzahl der Phagenpartikel in 2%iger Glycerinbouillon (pH 7,9) bestimmt (Abb. 12 u. 13 S.,4o u. 41).

Abb.12: Inaktivierung des B-Phagen durch chemische Mittel.

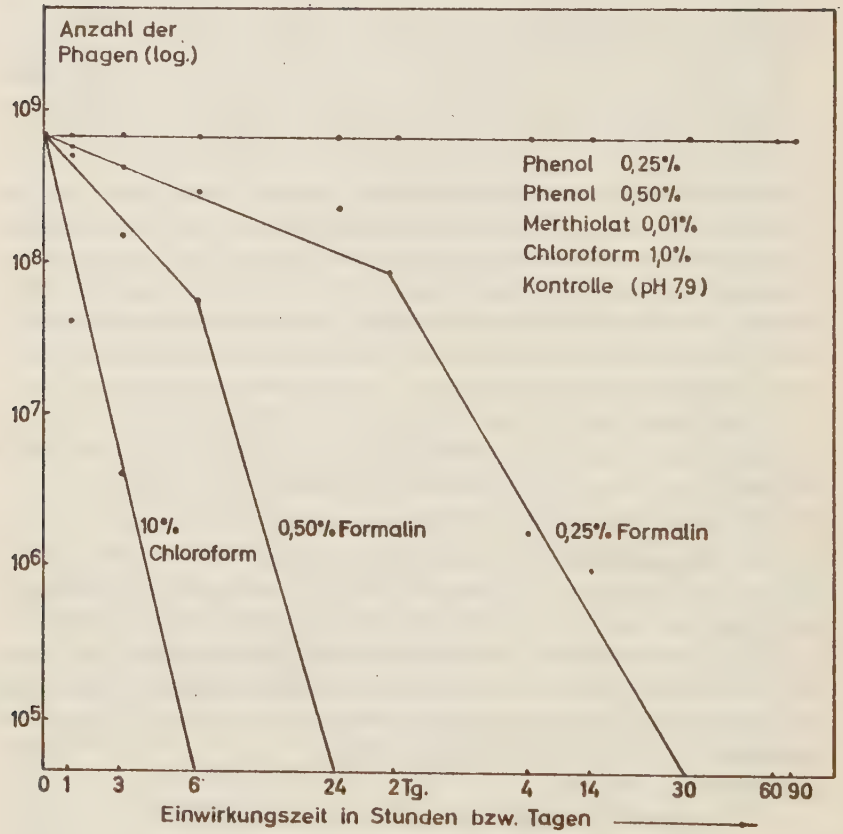
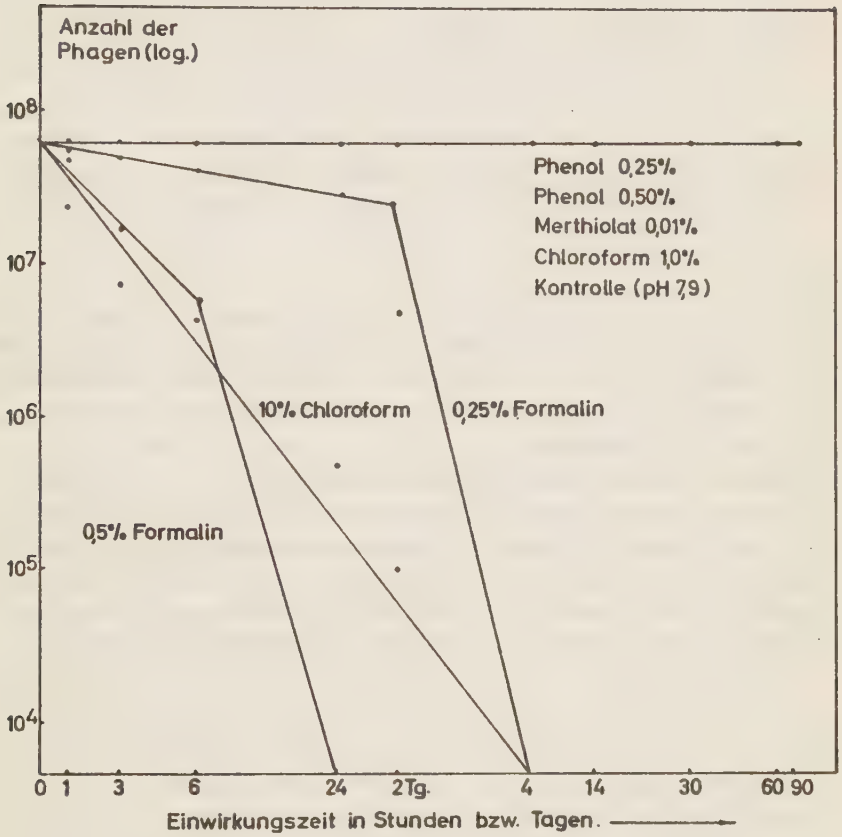


Abb. 13: Inaktivierung des R-Phagen durch chemische Mittel.



Wie aus den in Abb. 12 und 13 (S. 4o u. 41) eingetragenen Werten ersichtlich ist, führten o,25 und o,5o%iges Phenol, 1,o%iges Chloroform und o,o1%iges Merthiolat zu keiner Inaktivierung der beiden Phagenstämme.

Auf den B-Phagen hatte von den geprüften chemischen Substanzen 1o%iges Chloroform die stärkste inaktivierende Wirkung. Nach 3 Stunden Einwirkungszeit waren nur noch o,5% und nach 6 Stunden keine Phagenpartikel nachweisbar.

Formalin in o,25%iger Konzentration inaktivierte in 3 Stunden 35,8%, in 2 Tagen 9o,o% und in 3o Tagen 1oo% der B-Phagenpartikel, während mit o,5%igem Formalin eine vollständige Inaktivierung aller B-Phagenteilchen schon in 24 Stunden erreicht wurde.

Ein Vergleich dieser und der Versuchsergebnisse mit dem R-Phagen zeigt, dass der R-Phage gegen die Einwirkung von 1o%igem Chloroform resistenter als der B-Phage ist. Nach 3 Stunden Einwirkungszeit waren noch 12,5% und erst nach 4 Tagen keine Phagenpartikel mehr nachzuweisen.

Dagegen war der R-Phage gegenüber o,25%igem Formalin weniger resistent als der B-Phage. Schon nach 4 Tagen war der R-Phage und der B-Phage erst nach 3o Tagen vollständig inaktiviert. Gegenüber o,5%igem Formalin verhielten sich beide Phagen gleichsinnig. Nach 3 Stunden war die B- bzw. R-Phagensuspension zu 78,6% bzw. 75,o% und nach 24 Stunden vollständig inaktiviert.

IV. Diskussion

Schon HABESHIMA (192o) konnte eine hohe Hitzeresistenz des d'Herelle'schen Phagen nachweisen. Dieser Shigella-Phage wurde erst durch Temperaturen von 75°C inaktiviert, woraus HABESHIMA eine Fermentwirkung folgerte. Seitdem sind zahlreiche Versuche über die Wärmeinaktivierung von Phagen durchgeführt worden. Die Verschiedenartigkeit der Bakteriophagen zeigt sich auch in ihrer unterschiedlichen Hitzebeständigkeit. Während auf der einen Seite nach ATKINSON (1957) Salmonella-Phagen eine Erhitzung auf 8o° - 85°C 3o Minuten überstehen, werden auf der anderen Seite nach RAETTIG (1954) Coliphagenpartikel schon bei 6o°C inaktiviert.

Die Thermoempfindlichkeit von Mykobakteriophagen wurde zuerst von GARDNER und WEISER (1947) untersucht, die auch als erste Mykobakteriophagen isolierten. Der von ihnen untersuchte M.smegmatis-Phage wurde von 75°C in 1o Minuten vollständig inaktiviert. WHITTAKER (195o) prüfte die Thermostabilität zweier von ihm isolierter M.smegmatis-Phagen. Auch diese Phagen wurden in 1o Minuten durch eine Erhitzung auf 75°C vollständig inaktiviert. HNATKO (1953) fand, dass 11 Phagen, die er aus Erde isoliert hatte, durch Temperaturen zwischen 65° und 85°C inaktiviert wurden. Schliesslich waren es REDMOND und CATER (196o), die den Phagen DS6A, der den M.tuberculosis Stamm H37Rv lysierte, durch Wärme zu inaktivieren versuchten; nach 1o Minuten war dieser Phage bei 7o°C vollständig und bei 56°C nach 6o Minuten zu 75-8o% inaktiviert.

SELLERS und RUNNALS (1961) versuchten, Mykobakteriophagen mit Hilfe ihrer Beeinflussbarkeit durch physiko-chemische Einwirkungen zu charakterisieren. Für ihre Untersuchungen standen ihnen der M.lacticola-Phage D28 und die Mykobakteriophagen D29 und D32 zur Verfügung. Sie prüften diese drei Phagen auf ihre Empfindlichkeit gegen niedrigere Temperaturen. Bei allen drei Phagen beobachteten sie einen linearen Abfall der Aktivitätskurve bei 54°C. Ein ähnliches Bild der Kurvenverläufe zeigte auch der Phage D29 bei einer Temperatur von 56°C. Dagegen

war der Kurvenverlauf für die beiden Phagen D28 und D32 bei 56°C und für alle drei von ihnen geprüften Phagen bei 58° und 6o°C verschieden. Bei der graphischen Darstellung, in der im logarithmischen Masstab die aktiven Phagenpartikel gegen die Zeit aufgetragen wurden, entstanden Thermoinaktivierungskurven, in deren ersten Abschnitten die Phagen schneller inaktiviert wurden als in den zweiten. Solche Inaktivierungskurven können nach WOESE (196o) durch eine angeborene unterschiedliche Resistenz innerhalb einer Phagenpopulation erklärt werden. Nach SELLERS und RUNNALS (1961) bzw. WOESE (196o) kommen auch zwei oder mehrere Reaktionen, die verschiedene Phagenkomponenten betreffen, in Betracht. Diskutiert wird die Möglichkeit, dass empfindlichere Phagenpartikel während des ersten Teils der Temperatureinwirkung als erste Reaktion zu 9o% inaktiviert werden, während die restlichen hitzeresistenteren Phagen erst bei höheren Temperaturen als zweite Reaktion beeinflusst werden. Die meisten Hitzeinaktivierungen von Viren und Bakteriophagen sollen nach WOESE in dieser Weise verlaufen.

Unsere Kurven über die Thermoinaktivierung der B- und R-Phagen bei 54, 56, 58, 6o und 65°C zeigten einen linearen Verlauf. Die Inaktivierung unserer beiden Phagenstämme scheint demnach als eine Reaktion erster Ordnung zu verlaufen. So kann aus den Abb. 6 und 7 (S. 27 u. 28) entnommen werden, dass eine lineare Beziehung zwischen den Einwirkungszeiten und dem log der Anzahl der jeweils noch nachweisbaren aktiven Phagenpartikel besteht. Die Neigungen der Geraden sind als ein Mass für die Geschwindigkeitskonstante anzusehen. Je höher die Temperaturen liegen, desto schneller verläuft die Inaktivierung im Sinne einer monomolekularen Reaktion.

BÖNICKE (1956/57) hat in seinen umfangreichen Untersuchungen über den Stoffwechsel von Stämmen verschiedener Arten und Varianten der Gattung Mycobacterium auch die Thermoempfindlichkeit der Katalase von 4 Stämmen der Species M.lacticola geprüft. Während bei 55°C die Katalase geschädigt wurde, führte die Erhitzung auf 6o°C nach einer Einwirkungszeit von 15 Minuten zu einem totalen, irreversiblen Verlust der Vermehrungsfähigkeit

aller Keime. Der von uns untersuchte M.lacticola-Phage (R-Phage) war bei 6o°C nach 3o Minuten vollständig inaktiviert. Bei Mykobakterien, speziell bei M.smegmatis, scheint die Hitzeresistenz der Phagen und der Bakterien nicht wesentlich voneinander abzuweichen.

Eine Zusammenstellung der bisherigen Ergebnisse über die Thermoinaktivierung von Mykobakteriophagen in neutralem Milieu bringt Tabelle 8.

Tabelle 8: Zusammenstellung der Ergebnisse der Thermoinaktivierungen von Mykobakteriophagen

Autor	Jahreszahl	Geprüfte Phagen	Geprüfte Temperatur in °C	Ergebnisse: Inaktivierung in Min.	Ergebnisse: keine Inaktivierung in Min.
GARDNER und WEISER	1947	M.smegm. - Phage	75°	1o	
WHITTAKER	195o	2 M.smegm. - Phagen	75°	1o	
REDMOND und CATER	196o	DS6A	56°		6o
			7o°	1o	
SELLERS und RUNNALS	1961	D28	54-58°		6o
			6o°	4o	
		D29	54-58°		6o
			6o°	6o	
		D32	54-56°		6o
			58°	5o	
			6o°	3o	

Unsere eigenen Versuche mit zwei Mykobakteriophagenstämmen (B- und R-Phage) sowie die Sichtung der wenigen einschlägigen Arbeiten zeigen, dass eine vollständige Inaktivierung dieser und anderer Mykobakteriophagenstämme bei 7o°C in höchstens 1o Minuten erreicht wird. Temperaturen von 6o°C inaktivierten dagegen den D32-Phagen und den B-Phagen erst nach 3o, den D28-Phagen nach 4o, den R-Phagen nach 45 und den D29-Phagen nach 6o Minuten. Durch 58°C wurden in 6o Minuten die Phagen D28 und D29 im Gegensatz zum D32, B- und R-Phagen nicht inaktiviert.

Eine 1-stündige Erhitzung aller geprüften Phagen auf 54°-56°C

liess nach dieser Zeit noch aktive Phagen nachweisen.
Die bis heute geprüften Mykobakteriophagen unterscheiden sich in ihrem Verhalten gegen Wärme nur unwesentlich. In ihrer Thermoresistenz im neutralen Milieu entsprechen somit die Mykobakteriophagen den Coliphagen (RAETTIG, 1954) und den Pasteurella - Phagen (KNAPP, 1963), die sich in dieser Eigenschaft deutlich von Salmonella-Phagen (ATKINSON, 1957) unterscheiden.

Die Inaktivierung von Phagen in Abhängigkeit von wechselnden Wasserstoffionenkonzentrationen des Suspensionsmediums wurde wiederholt experimentell untersucht. So berichtete SHWARTZMAN schon 1925 über das Verhalten eines Coliphagen in Pufferlösungen. Er brachte einen Coliphagen in Pufferlösungen von pH 2,8 bis 4,8. Nach 48 Stunden Einwirkung bei Zimmertemperatur wurden die Lösungen auf pH 7,o neutralisiert. In dieser Zeit wurde der Coliphage bei einem pH von 2,8 - 3,6 vollständig inaktiviert. Im Gegensatz zu seinen Beobachtungen erwies sich bei Untersuchungen von GRATIA (1938) ein Typhusphage in einem auf pH 3,o eingestellten Suspensionsmedium resistenter. Diese Beobachtungen konnte RUEGAMER (1954) für einige Coliphagen bestätigen. Er fand, dass die Coliphagen T_4 und T_6 vom neutralen Bereich bis zu einem pH-Wert von 2,8 des Suspensionsmediums in zwei Tagen nicht inaktiviert wurden. WAHL und BLUM-EMERIQUE (1949) prüften das Verhalten der Bakteriophagen C_{16} und S_{13} in Pufferlösungen mit pH 7,7 - 3,o. Bei ihren Versuchen achteten sie besonders auf konstante Temperatur (2o°C), auf den Ausschluss von Licht (Dunkelkammer) und vor allem auf den Ausschluss von Sauerstoff. Im pH-Bereich 7,7 - 4,o verlief die Inaktivierung der beiden Phagen noch langsam, während bei pH 4,o - 3,o in kurzer Zeit eine vollständige Inaktivierung erreicht wurde. GÖNNERT und BOCK (1955) prüften neben verschiedenen Viren auch den Coliphagen T_4 auf seine pH-Resistenz in Pufferlösung. Aus ihren Versuchen geht hervor, dass der Coliphage T_4 durch pH-Werte von 5,o - 9,o nicht nennenswert beeinflusst wird. Eine auffällige Resistenz stellten sie im alkalischen Bereich fest, denn selbst bei pH 11,o war nach 6o Minuten der Coliphage T_4 noch nachzuweisen. Im sauren Bereich um pH 2,o dagegen konnten keine Phagen-

partikel mehr nachgewiesen werden. Die Resistenz von Coliphagen im stark alkalischen Gebiet konnte von KERBY und Mitarb. (1949) bestätigt werden, denn bei pH-Werten von lo-11 konnte beim Coliphagen T_7 kein Titerabfall festgestellt werden.

Ähnliche Ergebnisse erhielten HEICKEN und SPICHER (1957) für den Coliphagen T_3. Bei pH 4,o war der Phagentiter in Pufferlösungen (Citratpuffer) schon bei Zimmertemperatur in 6 Stunden von lo^8 auf lo^4 gesunken. Bei den pH-Werten 2,o und 3,o wurde die biologische Aktivität des T_3-Phagen sofort zerstört. Dass in stark sauren Bereichen (pH 3,o) eine schnelle, vollständige Inaktivierung von Phagen eintritt, wird auch durch die Untersuchungen von KNAPP (1963) an Pasteurella-Phagen bestätigt. Schon nach 6 Stunden Aufenthaltszeit in einer Proteoselösung mit pH 3,o waren der PST-Phage, der Y-Phage, der PTB-Phage, der R-Phage und der O_1-Phage vollständig inaktiviert, bei pH 4,o in der gleichen Zeit auch der Y-, PTB- und R-Phage.

Aus diesen Versuchen kann gefolgert werden, dass die geprüften Phagenstämme besonders gegen eine zunehmende Säuerung des Milieus empfindlich sind und im neutralen Milieu ihre Aktivität am besten erhalten bleibt (SCHIOPPA, 1937).

Diese Folgerungen gelten auch für die pH-Empfindlichkeit von Mykobakteriophagen, wie aus den Untersuchungen von SELLERS und RUNNALS (1961) und von uns hervorgeht. SELLERS und RUNNALS prüften die Empfindlichkeit der in Bouillon mit pH 4,o und lo,o suspendierten Mykobakteriophagen D28, D29 und D32 bei einer Einwirkungszeit von 1 Stunde und einer Temperatur von 37°C. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen zeigen, dass der Phage D28 seine grösste Stabilität zwischen pH 6,o und lo,o der Phage D29 zwischen pH 7,o und lo,o und der Phage D32 zwischen pH 7,o und 9,o besitzt. Bei pH 4,o waren dagegen für alle 3 Phagen nach 1 Stunde keine Phagenartikel mehr nachweisbar.

Obwohl in diesen Versuchen die pH-Empfindlichkeit der Phagen nur eine Stunde lang geprüft wurde, lässt der Vergleich mit unseren, über eine Einwirkungszeit von 5oo Stunden gehenden Versuchen erkennen, dass der B- und R-Phage zwischen pH 7,o

und 8,o am stabilsten sind. Für den B- und R-Phagen übereinstimmende Ergebnisse wurden auch im stark sauren Milieu (pH 3,o - 4,o) erzielt; beide Phagen wurden in 3 Stunden vollständig inaktiviert.

Die Vermehrung von Bakteriophagen hängt von verschiedensten Bedingungen ab. Von Bedeutung sind u.a. die Temperatur, die pH-Einstellung des Kultur- oder Suspensionsmediums und die Bakterien- bzw. Phagenmenge. So sahen wir bei konstanter Beimpfungsmenge der Bakterien und Bebrütungsdauer der Kulturen eine Phagenvermehrung für den B-Phagen vor allem im pH-Bereich von 7,o - 8,o und für den R-Phagen von pH 7,o - 8,5.

Auch OVERCAST, NELSON und PARMELEE (1951) konnten einen Einfluss der Wasserstoffionenkonzentrationen auf die Vermehrung von Phagen nachweisen, indem sie die Anreicherung von 5 Streptococcus lactis-Phagen in Bakterienkulturen bei 37°C untersuchten. Alle 5 Phagenstämme vermehrten sich im pH-Bereich von 5,4 - 7,5. Dass die Wasserstoffionenkonzentration für die Phagenvermehrung von Bedeutung ist, wurde auch durch die Untersuchungen von GOLD und WATSON (195o) bestätigt. Ihre Ergebnisse zeigten, dass bei der Vermehrung von Clostridium Madisonii-Phagen die Phageninfektion und die Lysis der Bakterien von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt. So beobachteten sie im pH-Bereich von 5,2 - 6,9 einen stufenweisen Anstieg der Phagenvermehrung. Bei pH-Werten über 6,9 dagegen blieb der Phagentiter konstant, weil die Phagen am Eindringen in die Bakterienzellen gehindert werden sollen. Nur wenige Versuche, Phagen in Suspensionslösungen mit wechselnder pH-Einstellung durch Wärme zu inaktivieren, wurden bisher durchgeführt. SCHEIDEGGER (1923) fand, dass ein Coli-Phage in einer Pufferlösung mit pH 4,5 gegen mehrstündige Einwirkung von Temperaturen zwischen 2o° und 37°C resistent war, dagegen nach einer Einwirkungstemperatur von 56°C in 2 Stunden vollständig inaktiviert wurde. In Übereinstimmung mit der Feststellung von SIERAKOWSKI und ZUBLUDOWSKA (193o), dass Phagen in neutralem Suspensionsmedium höhere Temperaturen vertragen, ergaben die Versuche von KRUEGER und SCRIBNER (1935), dass ein Staphylokokken-Phage in neutraler

Suspensionslösung am thermostabilsten war und im zunehmenden alkalischen Milieu die Hitzeresistenz dieses Phagen wieder abnahm. Bei einem pH-Wert der Phagensuspensionslösung von 7,o und 6,5 bzw. 6,o waren bei einer Temperatur von 52°C noch 34 bzw. 32% der ursprünglich nachweisbaren aktiven Staphylokokken-Phagenpartikel vorhanden. Bei Alkalisierung der Suspensionslösung dagegen wurden die Phagenteilchen nach einer halben Stunde zu 24%, bei pH 8,5 zu 1o% und bei pH 9,o zu o,7% inaktiviert.

Für Mykobakteriophagen fanden wir in der Literatur keine diesbezüglichen Untersuchungen, so dass sich unsere Ergebnisse mit denen anderer Mykobakteriophagen nicht vergleichen lassen. Wir können durch unsere Versuchsergebnisse (Versuch 4, S. 18) beim Vergleich mit denen bei anderen Phagenarten nur bestätigen, dass die Geschwindigkeit der thermischen Phageninaktivierung von der Wasserstoffionenkonzentration mit beeinflusst wird. Für die B- und R-Phagen fanden wir die grösste Thermostabilität im neutralen Milieu. Allerdings war die Stabilität im Gegensatz zu KRUEGER und SCRIBNER (1935) auch noch im alkalischen Bereich bis pH 8,o vorhanden. Bei stärkerer Alkalisierung der Phagensuspensionslösung (pH 9,o) wurden beide Mykobakteriophagen in zunehmender Stärke thermoinaktiviert. Der stärkste den B- und R-Phagen inaktivierende Einfluss der Temperaturen von 56° und 6o°C war in saurem Milieu (pH 5,o) festzustellen. So wurde die B- bzw. R-Phagensuspension bei pH 5,o und einer Inaktivierungstemperatur von 56°C in 15 bzw. 2o Minuten und bei einer Temperatur von 6o°C sofort inaktiviert.

Bei unseren Thermoinaktivierungsversuchen in Suspensionsmedien mit verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen sind die Phagen dem Einfluss der Wärme und der wechselnden Wasserstoffionenkonzentration ausgesetzt. Vergleicht man die Ergebnisse der Phageninaktivierungsversuche im neutralen Milieu bei Temperaturen von 56° und 6o°C (Abb. 6 u. 7, 8 - 11, S. 27 u. 28, S. 32 - 35) und im pH-Bereich von 5,o - 9,o bei 37°C (Abb. 8 - 11, S. 32-35) mit den Ergebnissen der Thermoresistenzversuche bei wechselnden Wasserstoffionenkonzentrationen des Suspensionsmediums (Abb. 8 - 11, S. 32 - 35), so ergibt sich, dass die Inaktivie-

rungsrate der Phagenpartikel bei 37°, 56° und 6o°C umso höher ist, je saurer (pH 5,o bis 6,o) oder alkalischer (pH 8,o - 9,o) die Suspension ist. Die Inaktivierung der Phagen durch Temperaturen von 56° und 6o°C und durch Säuerung oder Alkalisierung des Suspensionsmediums übersteigt die einfache Addition der beiden Teileffekte. Eine sichere Deutung der Befunde setzt eine grössere Anzahl entsprechender Versuche voraus.

Unsere bisherigen Versuche der Phageninaktivierung durch Temperaturen von 56° und 6o°C im neutralen oder alkalischen Milieu (pH 8,o) oder durch pH-Verschiebungen im Suspensionsmedium in den sauren oder alkalischen Bereich (pH 5,o - 6,o bzw. pH 8,o bis 9,o) zeigen jedenfalls, dass im logarithmischen Masstab die Kurven linear verlaufen.

Die Phagenempfindlichkeit oder - resistenz gegen chemische Stoffe wird aus verschiedenen Gründen geprüft. Einmal lassen sich verschiedene Phagen durch ihre gleiche oder unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Mitteln charakterisieren, zum anderen werden Mittel gesucht, die gegenüber den geprüften Phagen indifferent sind und somit unter Umständen als Konservierungsmittel in Betracht kommen.

Unter den Stoffen, die am häufigsten in ihrer inaktivierenden oder konservierenden Wirkung auf Phagen geprüft wurden, sind u.a. vor allem Phenol, Formalin und Chloroform zu nennen. In Tabelle 9 sind die Untersuchungen verschiedener Autoren über den Einfluss von chemischen Mitteln auf Phagen zusammengestellt. Schon diese Zusammenstellung zeigt sehr deutlich, dass Phenol in Konzentrationen von o,25 - 1,o% keinen inaktivierenden Einfluss auf die genannten Phagen besitzt. Auf diese Tatsache wiesen schon früher WATANABE (1924) nach zahlreichen Desinfektionsversuchen an Shigella- und Coli-Phagen, KLIGLER und OLITZKY (1931) und WELIS und SHERWOOD (1934) an Coli-, Shigella-, Megatherium- und Staphylokokken-Phagen und in letzter Zeit KNAPP (1963) an Pasteurella pseudotuberculosis-, postis- und einen Salmonella-Phagen hin.

Tabelle 9: Zusammenstellung von Untersuchungen über den Einfluss von chemischen Mitteln auf verschiedene Phagenarten

Autor	Jahres-zahl	Geprüfte Phagen	Geprüfte Mittel	Ergebnisse: Konzentration	Ergebnisse: Inaktivierung in Std./Tagen	Ergebnisse: keine Inaktivier. in Std. Tagen/Mon.
SUGINO	1932	Pestphagen	Phenol	1,o %		1 Std.
MARUYAMA	1937	Bacterioides-Phage	Phenol	1,o %		5 Tage
KNAPP	1963	PST-, Y-, PTB-,R-und O_1-Phagen	Phenol	o,25% o,5o%		4 Mon.
YOSHIZUMI	193o	Typhusphage	Formalin	o,4o%	1o Std.	
LEGROUX	1932	Typhusphage	Formalin	o,5o%	7 Tage	
KNAPP	1963	PST-,Y-,PTB-, O_1-Phagen	Formalin	o,25%	1-3 Std.	
		PST-,Y-, PTB-,R- und O_1-Phagen	Formalin	o,5o%	1 Std.	
CALLOW	1927	Staphylokok.-Phage	Chloroform	o,6o%		Std.
TEMPE und UHLHORN	1932	Staphylokok.-Phage	Chloroform	-	3 Tage	
MARUYAMA	1937	Bacterioides-Phage	Chloroform	1,o%		2 Tage
KNAPP	1963	PST-,Y-, PTB-,R- und O_1-Phagen	Chloroform Chloroform	1,o% 1o,o%		4 Mon.

- = keine Konzentrationsangabe

Gegen die Einwirkung von Formalin scheinen dagegen Bakteriophagen empfindlich zu sein, wie aus der tabellarischen Übersicht (S. 51) hervorgeht. YOSHIZUMI (1930) stellte fest, dass ein Typhusphage durch Zusatz von 0,40%igem Formalin zum Suspensionsmedium in 10 Stunden inaktiviert wurde. Eine vollständige Inaktivierung eines Typhusphagen in 7 Tagen erreichte LEGROUX (1932), indem er zu einer hochwirksamen Typhusphagen-Bouillon 0,50%iges Formalin hinzufügte. Bei den von KNAPP (1963) untersuchten Past.pseudotub.-, pestis- und Salmonella-Phagen waren nach 1 - bzw. 1 - 3 stündiger Einwirkung von 0,25 bzw. 0,50%igem Formalin in Proteoselösung keine aktiven Phagenpartikel mehr nachzuweisen.

Die Wirkung von Formalin auf Coliphagen wurde u.a. von HEICKEN und SPICHER (1957) untersucht. Nach ihren Untersuchungen ist die Inaktivierung der Phagen durch Formalin als eine Inaktivierung des Eiweisses aufzufassen, wobei Amino-, Imino- und Sulfhydril-Gruppen mit Formalinmolekülen reagieren sollen. Diese Reaktionen laufen schon bei Zimmertemperaturen ab und werden durch Erhöhung des pH-Wertes über 7,0 beschleunigt. Sie konnten am Modell des T_3-Phagen zeigen, dass die Inaktivierung des Phagen durch Formalin im Sinne einer monomolekularen Reaktion verläuft. Keine so einheitlichen Befunde wie über die Beeinflussbarkeit von Phagen durch Phenol und Formalin sind dagegen in der Literatur über die Wirkung von Chloroform zu gewinnen (Tab. 9, S.51). Schon d'HERELLE (1921) konnte den von ihm entdeckten Shigellaphagen durch Chloroform nicht inaktivieren. Zu den gleichen Ergebnissen kamen KUTTNER (1923), FREDERICQ (1950) und SECHAUD und KELLENBERGER (1956), die Chloroform zur Konservierung von Phagen verwendeten. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen verhielten sich bei den Untersuchungen von TEMPE und UHLHORN (1932) ein Staphylokokken-Phage und der Salmonella-Phage P 22 (PRELL, 1960) weniger resistent gegen Chloroform.

Versuche, Mykobakteriophagen durch chemische Mittel zu inaktivieren, sind bis auf zwei Angaben über den Einfluss von Chloroform auf Mykobakteriophagen (PIGUET, 1960, REDMOND, 1963) nicht unternommen worden.

Der Vergleich unserer Versuchsergebnisse (Versuch 8, Abb. 12 u. 13, S. 4o u. 41) mit denen bei anderen Phagenarten (Tab. 9, S. 51) ergibt übereinstimmende Ergebnisse. Die von uns untersuchten Mykobakteriophagen wurden durch o,25%iges und o,5o%iges Phenol selbst in 3 Monaten nicht inaktiviert. Eine weitere Übereinstimmung unserer Befunde mit den für andere Phagen gewonnenen zeigen die Ergebnisse der Inaktivierung durch Formalin. Der B- bzw. R-Phage wurde durch o,25%iges Formalin in 3o Tagen bzw. 4 Tagen vollständig inaktiviert, während bei einer Konzentration von o,5o% schon nach 24 Stunden keine aktiven B- und R-Phagenpartikel mehr nachweisbar waren.

Über die Wirkung von Chloroform auf Mykobakteriophagen fanden wir in der Literatur nur zwei Angaben. PIGUET (196o) berichtete, dass Chloroform in ungefähr einer Minute die "Cossonay"-Phagenpartikel über mehr als 9o% inaktiviert. REDMOND (1963) fand, dass die Konzentration von Chloroform und die Dauer seiner Einwirkung das Ausmass der Inaktivierung bestimmen. Er benutzte für die Untersuchungen den Phagen DS4 und den saprophytären Mykobakterienstamm ATCC 6o7. Mit 3 Tropfen Chloroform/5ml Suspension wurden in 2o - 3o Minuten die Bakterien getötet, ohne dass die Phagen gleichzeitig inaktiviert worden wären. Wurde dagegen die Konzentration des Chloroforms verdoppelt oder die Einwirkungszeit verlängert, so ging die Zahl der aktiven Phagenteilchen auf 5o - 1o% zurück. In unseren Versuchen sahen wir vor allem eine Abhängigkeit der Inaktivierung der Mykobakteriophagen von der Konzentration des Chloroforms. Die geprüfte Einwirkungszeit schien keinen Einfluss auf die Inaktivierung des B- und R-Phagen gehabt zu haben. So sahen wir bei 1%igem Chloroform in 3 Monaten keinen Rückgang der B- bzw. R-Phagenpartikel; die Ergebnisse stimmen mit denen bei anderen Phagen beobachteten überein (Tab. 9 S. 51). Im Gegensatz zum 1%igen Chloroform führte 1o%iges Chloroform zu einer Inaktivierung der Mykobakteriophagen, wobei sich der R-Phage resistenter als der B-Phage erwies. Durch 1o%iges Chloroform wurde der B-Phage in 6 Stunden und der R-Phage in 4 Tagen inaktiviert. Unsere Ergebnisse über die Wirkung von 1o%igem Chloroform entsprachen somit denen von TEMPE und UHLHORN (1932), PIGUET (196o) und REDMOND (1963).

Wie die Kurven der Inaktivierung durch Wärme und durch Säuerung oder Alkalisierung des Suspensionsmediums zeigen die Kurven der Inaktivierung der beiden Phagenstämme durch 1o%iges Chloroform einen linearen Verlauf.
CLIFTON (1923) empfahl, therapeutisch angewandte Dysenterie-Phagensuspensionen mit o,o1% Merthiolat zu konservieren (nach OESTERLE und JUNGHANS, 195o). In der gleichen Konzentration prüften wir seine Wirksamkeit gegen den B- und R-Phagen. Nach einer Einwirkungszeit von 3 Monaten war für beide Phagen kein Titerrückgang festzustellen. Gleiche Ergebnisse erhielt KNAPP (1963) für Past.pseudotuberculosis, Past.pestis und einen Salmonella-Phagen, die in 4 Monaten keine Inaktivierung durch Merthiolat nachweisen liessen.

V. Zusammenfassung

Es wird über Untersuchungen mit den zwei Mykobakteriophagenstämmen SN47 (M.smegmatis-Phage = B-Phage) und M.lacticola-Phage (R-Phage) berichtet, deren Ergebnisse mit den in der Literatur mitgeteilten Beobachtungen an anderen Mykobakteriophagenstämmen und an weiteren für andere Bakterienarten infektiösen Phagen verglichen werden. Vorversuche befassten sich mit den Möglichkeiten einer optimalen Anreicherung in flüssigen Nährmedien, dem Aussehen der Plaques in Abhängigkeit von den gewählten Versuchsbedingungen und der lytischen Wirkung der beiden Phagenstämme auf Stämme homologer bzw. heterologer Mykobakterienarten. Die Untersuchungen und Ergebnisse der Vorversuche sind im Kap. III, Abschn. 1-3 der Arbeit zusammengestellt.

Weitere Untersuchungen befassten sich mit der inaktivierenden Wirkung wechselnder Temperaturen oder unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentration im Suspensionsmedium der Phagen bzw. Bakterienkulturen, denen die Phagenstämme zugegeben wurden, und ihrer Abhängigkeit von der Einwirkungszeit. Schliesslich wurde noch die Phagenresistenz gegen verschiedene chemische Substanzen wie Phenol, Formalin, Chloroform und Merthiolat geprüft.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass der B-Phage durch Temperaturen von 7o° und 75°C in 5 Minuten, von 65°C in 1o, von 6o°C in 3o und von 58°C in 6o Minuten vollständig inaktiviert wird. Bei 56°C wurden in 1 Stunde 99,6% und bei 54°C 6o,6% der Phagenpartikel einer B-Phagensuspension inaktiviert.

Der R-Phage verhielt sich mit folgenden Ausnahmen wie der B-Phage: Durch 65° bzw. 6o°C wurde er in 5 bzw. 45 Minuten vollständig inaktiviert. Durch eine 1-stündige Erhitzung auf 58°, 56° bzw. 54°C wurden die aktiven Phagenpartikel um 99,8%, 59,1% bzw. 8,4% reduziert. Unsere Thermoinaktivierungskurven zeigten linearen Verlauf.

Eine Inaktivierung des B- und R-Phagen konnte auch mit zunehmender Säuerung oder Alkalisierung des Suspensionsmediums erreicht werden. Der B-Phage wurde im pH-Bereich von 7,o - 8,o in 5oo Stun-

den nicht und im pH-Bereich von 3,o und 4,o bzw. 1o,o und 11,o in 3 Stunden vollständig inaktiviert. Suspensionen mit einer pH-Einstellung auf pH 5,o oder pH 6,o und pH 9,o führten in 5oo Stunden zu einer Inaktivierung von 97,4% oder 85,3% und 9o,o% der Phagenpartikel.

Gleiche Ergebnisse sahen wir in unseren Versuchen mit dem R-Phagen in Suspensionen mit pH-Werten von 3,o, 4,o, 7,o, 8,o und 11,o. Eine pH-Einstellung auf pH 6,o und 9,o führte in 5oo Stunden zu einer Inaktivierung um 66,o% und 9o,5% Phagenpartikel. Suspensionen mit pH 5,o bzw. 1o,o wurden in 5oo bzw. 6 Stunden vollständig inaktiviert. Alle Kurven der Inaktivierung durch wechselnde Wasserstoffionenkonzentrationen verliefen linear.
Nach dem Ergebnis unserer Vorversuche und dieser Untersuchungen ist eine optimale Anreicherung des R-Phagen im pH-Bereich von 7,o - 8,o und des B-Phagen von 7,o - 8,5 bei einer Infektion von $1.1o^8$ Keimen/ml und einer Infektionsdauer von 2 Stunden bei 37°C zu erreichen.

Die Untersuchungen über die Thermoresistenz der Phagen in Bakteriensuspensionen mit verschiedenen pH-Werten zeigen, dass der B-Phage bei 56° bzw. 6o°C in einem Milieu mit pH 5,o, 6,o und 9,o in 15 bzw. 5 Minuten, 6o bzw. 15 und 45 bzw. 1o Minuten vollständig inaktiviert wird.

Dagegen blieben vom R-Phagen bei 56°C bzw. 6o°C in einem Milieu mit pH 5,o in 2o bzw. 5 Minuten keine, mit pH 6,o in 6o Minuten noch 1,3% bzw. in 45 Minuten keine, in einem Milieu mit pH 9,o in 6o Minuten noch o,6% bzw. in 3o Minuten keine Phagenpartikel mehr nachweisbar.

Von den auf ihre Mykobakteriophagen hemmende Wirkung geprüften chemischen Substanzen inaktivierten den B-Phagen Phenol in o,25 und o,5o%iger, Chloroform in 1,o%iger und Merthiolat in o,o1%iger Konzentration in 3 Monaten nicht. Dagegen führte o,25%iges Formalin in 3o Tagen, o,5o%iges Formalin in 24 Stunden und 1o%iges Chloroform in 6 Stunden zu einer vollständigen Inaktivierung aller Phagenpartikel. Beim R-Phagen, der sich mit wenigen Ausnahmen wie der B-Phage verhielt, trat eine Inakti-

vierung durch o,25%iges Formalin und durch lo%iges Chloroform in 4 Tagen ein.

VI. Literaturverzeichnis

ATKINSON, N., and BULLAS, C.R.: Salmonella Bacteriophages. 6. Some heat resistant phages. Austr. J.Exp.Biol. 35, 193-208 (1957).

BÖNICKE, R.: Stoffwechsel der verschiedenen Arten und Varianten der Gattung Mycobacterium. JBer.Borstel 4, 43-172 (1956/57).

BÖNICKE, R.: Stoffwechsel und Stoffwechselprodukte von Mycobakterien. Kolloquium Borstel 21./22. Mai 1963, Fischer-Verlag, Stuttgart, 1964.

BOWMAN, B.U., jr.: Quantitative studies on some mycobacterial phage-host systems. J.Bact. 76, 52-62 (1958).

CALLOW, B.R.: Further studies on Staphylococcus bacteriophage. J.infect. Dis. 41, 124 (1927).

FREDERICQ, P.: Technique simple et rapide de culture et de conservation de entéro-bactériophages. C.r.Soc. Biol. 144, 295 (1950). - Ref. in: Zbl.Bakt. I Ref. 150, 136 (1952).

FROMAN, S., WILL, D.W., and BOGEN, E.: Bacteriophage active against virulent Mycobacterium tuberculosis. 1. Isolation and activity. Amer.J.Publ. Hlth. 44, 1326-1333 (1954).

FROMAN, S., WILL, D.W., BLISSE, A., CONDE, L.J., KRASNOW, I., and BOGEN, E.: Bacteriophage susceptibility and cultural characteristics of BCG and other tubercle bacilli. Dis. Chest. 28, 377 (1955).

GARDNER, G.M., and WEISER, R.S.: A bacteriophage for Mycobacterium smegmatis. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 66, 205-206 (1947).

GÖNNERT, R., und BOCK, M.: Zur Resistenz von Viren. Z.Hyg.Infekt.Kr. 141, 60-63 (1955).

GOLD, W., and WATSON, D.W.: Studies on the bacteriophage cycle. II. Phage infection and lysis of Clostridium Madisonii, a function of pH. J. Bact. 59, 13 (1950).

GRATIA, A.: Des relations numériques entre bactéries lysogénes et particules de bactériophage. Ann. Inst. Pasteur 57, 652 (1936).

GRATIA, A.: Résistance des bactériophages à l'acidité. C.r.Soc.Biol.Med. 127, 349 (1938). - Ref. in: Zbl.Bakt. I Ref. 130, 487 (1938).

HABÉSHIMA: Sur un ferment d'immunité bactériolysant, du mécanisme d'immunité infectieuse intestinale, de la nature du dit "microbe filtrant bactériophage" de d'Herelle. C.r.Soc.Biol. 83, 219 (1920). - Ref. in: Zbl.Bakt.I Ref. 72, 412 (1921).

HEICKEN, K., und SPICHER, G.: Über die Kinetik der Inaktivierung und Reaktivierung von Phagen. Zbl. Bakt. I Orig. 167, 97 (1957).

d'HERELLE, F.: Le bactériophage: Son rôle dans l'immunité. (Masson, Paris 1921).

HIKAWA, Y.: Studies on mycobacteriophage. Kekkaku 34, 467 (1959).

HNATKO, S.I.: Concentric ring formation about plaques of M.phlei bacteriophage. Canad.J.Publ.Hlth. 43, 54 (1952).

HNATKO, S.I.: The isolation of bacteriophages for mycobacteria with reference to phage typing of the genus. Canad. J.Med.Sci. 31, 462-473 (1953).

HNATKO, S.I.: The application of bacteriophages to the study of acid-fast micro-organisms from tuberculous patients. Canad.J.Microbiol. 2, 39 (1956).

JENSEN, K.A.: Reinzüchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillenstämmen. Zbl.Bakt.I Orig. 125, 222 (1932).

KÄPPLER, W.: Über den gegenwärtigen Stand der Mykobakteriophagen-Forschung. Z.Ärztl.Fortb. 54, 627-631 (1960).

KERBY, G.P., GOWDY, R.A., DILLIN, M.L., CZAKY, T.Z., SHARP, D.G., and BEARD, J.W.: Purification, pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of Escherichia coli. J.Immunol. 63, 93-107 (1949).

KLIGLER, I.J., and OLITZKY, L.: Studies on the protein-free suspensions of viruses. III. The resistance to heat and disinfectants of protein-free eluates of a bacteriophage and fowl-pox virus. Brit. J.exp. Path. 12, 393 (1931). - Ref. in:Zbl. ges. Hyg. 28, 586 (1933).

KNAPP, W.: Über unterschiedliches Verhalten von Pasteurella-Phagen. Zbl.Bakt. I Orig. 190, 39-46 (1963).

KRUEGER, A.P., and SCRIBNER, E.J.: Effect of pH on heat inactivation of bacteriophage. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 33, 21 (1935). - Ref. in:Zbl.Bakt.I Ref. 121, 238 (1936).

KUTTNER, A.G.: Bacteriophage phenomena. J.Bact. 8, 49 (1923). -Ref. in: Ber.ges.Biol. B 26, 237 (1924).

LEGROUX, R., et DJENUL, K.: Lyse bactérienne et formol, principe ana-bactériolytique. C.r.Soc.Biol. 1o9, 426 (1932). - Ref. in: Zbl.Bakt.I Ref. 1o9, 277 (1933).

MARUYUMA, H.: Studien über das Bakteriophagenphänomen der gramnegativen Bacterioidesarten. Mitt.med.Ges.Chiba 15, 7 (1937). - Ref. in Zbl.ges.Hyg. 39, 647 (1937).

OESTERLE,P., und JUNGHANS,R.: Die Konservierung von Bakteriophagen auf chemischem Wege. Deutsches Gesundheitswesen 1o38 (195o).

OVERCAST, W.W., NELSON, F.E., and PARMELEE, C.E.: Influence of pH on proliferation of lactic streptococcus bacteriophage. J.Bact. 61, 87 (1951).

PENSO, G., and ORTALI, V.: Studi e recerche sui micobatteri. Nota II. I fagi dei micobatteri. Rend. ist.super.sanità 12, 9o3-918 (1949).

PIGUET, J.-D.: Présence de deux variétés distinctes dans une souche de mycobactériophage. Ann.Inst.Pasteur 98, 147 (196o). Zit. nach Redmond, W.B.

PRELL, H.H.: Inaktivierung von Salmonella-Phage P 22 durch Chloroform. Arch.Mikrobiol. 36, 151-168 (196o).

RAETTIG, H.: Temperaturempfindlichkeit von fortzüchtbaren Lysinen und Bakteriophagen. Naturwissenschaften 41, 63 (1954).

REDMOND, W.B., and CATER, J.C.: A bacteriophage specific for Mycobacterium tuberculosis, varieties hominis and bovis. Amer.Rev.Resp.Dis. 82, 781 (196o).

REDMOND, W.B.: Bacteriophages of the Mycobycteria. A Review. Adv.Tuberc.Res. 12, 191-229 (1963).

RUEGAMER, W.R.: The role of cations in the reversible inactivation of coliphage in media of low ionic strength. I. The competitive action between H^+ and other cations. Arch.Biochem.Biophys. 5o, 269 (1954). - Ref. in: Ber.ges. Biol. A 94, 36 (1955).

SCHEIDEGGER, E.: Studien zum Bakteriophagenproblem. IV. Mitt. Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das lytische Agens und den Ablauf der übertragbaren Bakteriolyse. Z.Hyg.Infekt.Kr. 99, 4o3 (1923).

SCHIOPPA, C.; Sull'azione del pH dei liquidi batteriophagici sulla loro attività e conservazione, nei riguardi del potere litico. Giorn.Batter. 19, 664 (1937). - Ref. in: Zbl.Bakt.I Ref. 13o, 487 (1938).

SECHAUD, J., et KELLENBERGER,E.: Lyse précoce, provoquée par le chloroforme, chez les bactéries infectées par du bactériophage. Ann.Inst.Pasteur 90, 102 (1956). -Ref. in: Zbl.Bakt.I Ref. 161, 496 (1956).

SELLERS, M.I., TOKUYASU, K., PRICE, Z., and FROMAN, S.: Electron microscopic studies of mycobacteriophages. Amer.Rev. Tuberc. 76, 964 (1957).

SELLERS, M.I., and RUNNALS, H.R.: Mycobacteriophage. I. Physicochemical characterization. J.Bact. 81, 442-447 (1961).

SIERAKOWSKI, S., et ZUBLUDOWSKA, F.: Le pH limite des bactériophages. C.r.Soc.Biol. 103, 422 (1930). - Ref. in Zbl.Bakt. I Ref. 99, 384 (1930).

SHWARTZMAN, G.: The influence of partial inactivation upon the potency of the bacteriophage. Proc.Soc.exp.Biol. Med. 22, 324 (1925). - Ref. in: Zbl. ges. Hyg. 11, 299 (1926).

STEENKEN, W., jr.: Spontaneous lysis of tubercle bacilli on artificial culture media. II. Amer.Rev.Tuberc. 38, 777 (1938).

SUGINO, T.: On the bacteriophage against the plague bacillus. Kitasato Arch.f.inf.dis. 9, 72 (1932). - Ref. in:Zbl.Bakt. I Ref. 108, 328 (1932/33).

TAKEYA, K., and YOSHIMURA, T.: Isolation of bacteriophage against all types of mycobacterium tuberculosis. J.Bact. 74, 540 (1957).

TEMPE, G., et UHLHORN, M.: Action de l'éther et du chloroform sur le bactériophage. C.r.Soc.Biol. 109, 687 (1932). - Ref. in: Zbl.Bakt.I Ref. 109, 277 (1933).

WAHL, R., et BLUM-EMERIQUE, L.: Action du ph sur les bactériophages C_{16}, et S_{13}. Ann.Inst.Pasteur 73, 741 (1947). - Ref. in:Ber.ges.Biol. A 64, 278 (1949).

WATANABE, T.: Desinfektionsversuche mit Bakteriophagen. Arch.Hyg. 92, 1 (1924).

WELLS, A.Y., and SHERWOOD, N.P.: Selective action of dyes and other disinfectants on bacteriophages. J.infect. Dis. 55, 195 (1934).

WHITTAKER, E.: Two bacteriophages for mycobacterium smegmatis. Canad.J.Publ.Hlth. 49, 431-436 (1950).

WOESE, C.: Thermal inactivation of animal viruses. Ann. N.Y. Acad.Sci. 83, 741-751 (1960).

YOSHIZUMI, Y., NAGASE, K., and HOSOYA, S.: Reports on the so-called "anaphage" and its antigenic qualities. Jap.J.exp. Med. 8, 637 (1930). - Ref. in:Zbl. ges.Hyg. 24, 684 (1931).

Dem Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Tübingen, Herrn Prof. Dr. R.-E. Bader, bin ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes zu grossem Dank verpflichtet.

Mein weiterer herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Knapp für die Überlassung des Themas und seine wiederholten Beratungen in der Versuchsplanung und bei der Abfassung des Manuskriptes.

Lebenslauf

Ich wurde am 12. Juli 1938 als Sohn des damaligen Geschwaderarztes Dr. Emil Greul und seiner Ehefrau Irma, geb. Sievers, in Cuxhaven geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Tübingen und des Alten Gymnasiums in Bremen bestand ich im Februar 1958 die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1958 begann ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit dem Studium der Medizin. Nach der naturwissenschaftlichen und ärztlichen Vorprüfung in Tübingen setzte ich mein Studium in Kiel, Freiburg und Tübingen fort und legte am 13. Dezember 1963 das medizinische Staatsexamen ab.

Anschliessend begann ich meine Ausbildung als Medizinalassistent am Kreiskrankenhaus in Lemgo und den Städtischen Krankenanstalten in Bremen, wo ich zur Zeit noch tätig bin.